



**T.C**  
**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON**  
**ANABİLİM DALI**

**GEBELİK SIRASINDA SEVOFLURAN ANESTEZİSİ  
UYGULANAN FARELERİN YAVRULARINDA ORTAYA  
ÇIKACAK NÖROTOKSİSİTE, NÖROİNFLAMASYON  
VE DUYGUSAL DAVRANIŞLARDA VİTAMİN D’NİN  
ETKİLERİ**

**Dr. Bayram GÜLERYÜZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Feride KARACAER**

**ADANA- 2024**



**T.C**  
**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON**  
**ANABİLİM DALI**

**GEBELİK SIRASINDA SEVOFLURAN ANESTEZİSİ  
UYGULANAN FARELERİN YAVRULARINDA ORTAYA  
ÇIKACAK NÖROTOKSİSİTE, NÖROİNFLAMASYON VE  
DUYGUSAL DAVRANIŞLARDA VİTAMİN D’NİN  
ETKİLERİ**

**Dr. Bayram GÜLERYÜZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Feride KARACAER**

**ADANA- 2024**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez araştırmamı yapmaya başladığım ilk günden bitimine kadar tüm çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, iyi niyetli ve hoşgörölü yaklaşımıyla bu zorlu süreci kolaylaştıran, eğitici ve öğretici kimliği ile bana yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Feride KARACAER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve değerli katkılarını içtenlikle paylaşan başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Hakkı ÜNLÜGENÇ olmak üzere saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Dilek ÖZCENGİZ'e, Prof. Dr. Yasemin GÜNEŞ'e, Prof. Dr. Hasan Murat GÜNDÜZ'e, Prof. Dr. Mehmet ÖZALEVLİ'ye, Doç. Dr. Ersel GÜLEÇ'e, Doç. Dr. Mediha TÜRKTAN'a, Doç. Dr. Zehra HATİPOĞLU'na, Doç. Dr. Ebru BİRİCİK'e, Doç. Dr. Murat Türkeün ILGINEL'e, Doç. Dr. Demet LAFLI TUNAY'a,

Tez çalışmalarım döneminde değerli yardımlarını esirgemeyen Fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sait POLAT'a ve Araştırma Görevlisi Dr. Samet KARA'ya

Tez çalışmamda büyük bir sabır ve özveriyle katkıda bulunan ve deneysel uygulamasında bilgi ve deneyimlerini özveri ile paylaşan, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kübra AKILLIOĞLU'na

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Ranimasyon Anabilim Dalı çatısı altında birlikte çalıştığım, iyi günde kötü günde birlikte bir aile sıcaklığını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Anestezi ameliyathane, poliklinik ve yoğun bakımda çalışan hemşire, tekniker ve personel arkadaşlara teşekkür ederim.

Tez çalışmamı bugünlere gelmemde büyük emekleri bulunan, her türlü fedakarlığı gösteren sevgili babam Mustafa GÜLERYÜZ ve sevgili annem Rabiye GÜLERYÜZ ile kardeşlerim Afet, Zeynep ve Halit'e; her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini hep hissettiren, tez sürecim boyunca sabır ve özveri gösteren hayat arkadaşım Tuğçe AĞAR GÜLERYÜZ'e ithaf ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

|                                                         |      |
|---------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR.....                                           | i    |
| İÇİNDEKİLER.....                                        | ii   |
| TABLolar LİSTESİ .....                                  | v    |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                  | vi   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                     | viii |
| ÖZET .....                                              | ix   |
| ABSTRACT .....                                          | x    |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                  | 4    |
| 2.1.Genel Anestezi .....                                | 4    |
| 2.1.1. İnhalasyon Anestezisi.....                       | 5    |
| 2.2. Sevofluran .....                                   | 6    |
| 2.2.1. Fizikokimyasal özellikleri.....                  | 6    |
| 2.2.2. Farmakodinamik özellikleri .....                 | 7    |
| 2.2.3. Farmakokinetik özellikleri .....                 | 7    |
| 2.2.4. Organ sistemlerine etkileri .....                | 7    |
| 2.2.5. Sevofluran ve nöroinflamasyon .....              | 8    |
| 2.3. Gebede Nonobstetrik Cerrahide Anestezi .....       | 10   |
| 2.3.1. Gebelikteki fizyolojik değişiklikler: .....      | 10   |
| 2.3.2. Anestezik ajanların teratojenik etkileri: .....  | 11   |
| 2.3.3. Gebede Anestezi yönetimi: .....                  | 11   |
| 2.4. Nöroinflamasyon.....                               | 13   |
| 2.4.1. Nöroinflamasyon oluşumundaki mekanizmalar: ..... | 13   |
| 2.5. Apoptosis.....                                     | 15   |
| 2.6. D Vitamini.....                                    | 17   |
| 2.6.1. Vitamin D ve Nöroinflamasyon .....               | 18   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                 | 20   |
| 3.1. Etik .....                                         | 20   |

|                                                   |           |
|---------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. Deney Hayvanlarının Bakımı .....             | 20        |
| 3.3. Deney grupları .....                         | 20        |
| 3.4. Sevofluran Uygulaması .....                  | 23        |
| 3.5. Vitamin D uygulanması .....                  | 23        |
| 3.6. Davranış Bataryası .....                     | 23        |
| 3.6.1. Açık Alan Testi .....                      | 24        |
| 3.6.2. Yükseltilmiş Artı Düzenek .....            | 25        |
| 3.7. Elektron Mikroskopik Yöntemler .....         | 25        |
| 3.8. İmmünohistokimyasal Yöntemler .....          | 27        |
| 3.8.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi ..... | 28        |
| 3.9. İstatiksel Analiz .....                      | 29        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                          | <b>30</b> |
| 4.1. Duygusal Davranış Testi Bulguları .....      | 30        |
| 4.1.1. Açık alan testi .....                      | 30        |
| 4.1.2. Yükseltilmiş artı düzenek .....            | 35        |
| 4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular .....           | 41        |
| 4.2.1. Hipokampus .....                           | 41        |
| 4.2.1.1. Bax İmmünohistokimyası .....             | 41        |
| 4.2.1.2. Bcl-2 İmmünohistokimyası .....           | 43        |
| 4.2.1.3. IL-6 İmmünohistokimyası .....            | 44        |
| 4.2.1.4. TNF- $\alpha$ İmmünohistokimyası .....   | 46        |
| 4.2.1.5. c-Fos İmmünohistokimyası .....           | 48        |
| 4.2.1.6. Olig2 İmmünohistokimyası .....           | 49        |
| 4.2.1.7. BDNF İmmünohistokimyası .....            | 51        |
| 4.2.2. Prefrontal Korteks .....                   | 52        |
| 4.2.2.1. Bax İmmünohistokimyası .....             | 52        |
| 4.2.2.2. Bcl-2 İmmünohistokimyası .....           | 54        |
| 4.2.2.3. IL-6 İmmünohistokimyası .....            | 56        |
| 4.2.2.4. TNF- $\alpha$ İmmünohistokimyası .....   | 57        |
| 4.2.2.5. c-Fos İmmünohistokimyası .....           | 59        |
| 4.2.2.6. Olig2 İmmünohistokimyası .....           | 60        |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.2.7. BDNF İmmunohistokimyası.....                                     | 62        |
| 4.2.3. İmmunohistokimyasal Skarlama.....                                  | 63        |
| 4.2.4. İmmunohistokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi ..... | 65        |
| 4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular.....                                   | 69        |
| 4.3.1. Hipokampus .....                                                   | 69        |
| 4.3.1.1. Grup K .....                                                     | 69        |
| 4.3.1.2. Grup D .....                                                     | 70        |
| 4.3.1.3. Grup S .....                                                     | 72        |
| 4.3.1.4. Grup SD .....                                                    | 73        |
| 4.3.2. Prefrontal Korteks .....                                           | 75        |
| 4.3.2.1. Grup K .....                                                     | 75        |
| 4.3.2.2. Grup D .....                                                     | 76        |
| 4.3.2.3. Grup S .....                                                     | 78        |
| 4.3.2.4. Grup SD .....                                                    | 79        |
| <b>5. TARTIşMA .....</b>                                                  | <b>81</b> |
| <b>6. SONUÇ .....</b>                                                     | <b>88</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                    | <b>89</b> |

## TABLÖLAR LİSTESİ

| <b><u>Tablo No:</u></b>                                                                                          | <b><u>Sayfa No:</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Tablo 1.</b> Deney Grupları .....                                                                             | 22                      |
| <b>Tablo 2.</b> Elektron mikroskopik doku takip aşamaları .....                                                  | 26                      |
| <b>Tablo 3.</b> Resin (gömmme materyali) hazırlanışı .....                                                       | 27                      |
| <b>Tablo 4.</b> 7.Günde Hipokampus Dokusunda İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi.....  | 64                      |
| <b>Tablo 5.</b> 45.Günde Hipokampuste İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi.....         | 64                      |
| <b>Tablo 6.</b> 7.Günde Prefrontal Kortekste İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi.....  | 64                      |
| <b>Tablo 7.</b> 45.Günde Prefrontal Kortekste İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi..... | 64                      |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Şekil No:

### Sayfa No:

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. . Sevofluranın nöroinflamasyondaki etki mekanizmaları .....                          | 2  |
| Şekil 2. Sevofluranın kimyasal yapısı .....                                                   | 6  |
| Şekil 3. Sevofluran uygulaması .....                                                          | 23 |
| Şekil 4. Açık alan düzeneği .....                                                             | 24 |
| Şekil 5. Yükseltilmiş artı düzenek .....                                                      | 25 |
| Şekil 6. Açık alan testinde merkez alanda geçirilen süre (sn) .....                           | 30 |
| Şekil 7. Açık alan testinde perifer alanda geçirilen süre (sn).....                           | 31 |
| Şekil 8. Açık alan testinde kat edilen mesafe (cm).....                                       | 32 |
| Şekil 9. Açık alan testinde merkez alana geçiş sıklığı .....                                  | 33 |
| Şekil 10. Açık alan testinde ayağa kalkma sıklığı .....                                       | 34 |
| Şekil 11. Açık alan testinde merkez alana ilk giriş süresi (sn).. ..                          | 35 |
| Şekil 12. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kolda geçirilen süre (sn) .....                    | 36 |
| Şekil 13. Yükseltilmiş artı düzenekte kapalı kolda geçirilen süre (sn) .....                  | 37 |
| Şekil 14. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kola giriş sıklığı.....                            | 38 |
| Şekil 15. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kola ilk giriş süresi (sn). .....                  | 39 |
| Şekil 16. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kol 1/3 uç kısımdan aşağı baş uzatma sıklığı ..... | 40 |
| Şekil 17. Yükseltilmiş artı düzenekte açık ve kapalı kola toplam giriş çıkış sıklığı .....    | 41 |
| Şekil 18. Hipokampuste Bax immunreaktivitesi .....                                            | 42 |
| Şekil 19. Hipokampuste Bcl-2 immunreaktivitesi .....                                          | 44 |
| Şekil 20. Hipokampuste IL-6 immunreaktivitesi.....                                            | 46 |
| Şekil 21. Hipokampuste TNF- $\alpha$ immunreaktivitesi .....                                  | 47 |
| Şekil 22. Hipokampuste c-Fos immunreaktivitesi .....                                          | 49 |
| Şekil 23. Hipokampuste Olig2 immunreaktivitesi.....                                           | 50 |
| Şekil 24. Hipokampuste BDNF immunreaktivitesi .....                                           | 52 |
| Şekil 25. Prefrontal Kortekste Bax immunreaktivitesi. ....                                    | 54 |
| Şekil 26. Prefrontal kortekste Bcl-2 immunreaktivitesi.....                                   | 55 |
| Şekil 27. Prefrontal kortekste IL-6 immunreaktivitesi .....                                   | 57 |
| Şekil 28. Prefrontal kortekste TNF- $\alpha$ immunreaktivitesi.....                           | 58 |
| Şekil 29. Prefrontal kortekste c-Fos immunreaktivitesi.....                                   | 60 |
| Şekil 30. Prefrontal kortekste Olig2 immunreaktivitesi. ....                                  | 61 |
| Şekil 31. Prefrontal kortekste BDNF immunreaktivitesi.....                                    | 63 |
| Şekil 32. Bax için immunohistokimyasal skorlama.....                                          | 65 |
| Şekil 33. Bcl-2 için immunohistokimyasal skorlama .....                                       | 66 |
| Şekil 34. IL-6 için immunohistokimyasal skorlama.....                                         | 66 |

|                  |                                                                                                 |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 35.</b> | TNF- $\alpha$ için immunohistokimyasal skorlama .....                                           | 67 |
| <b>Şekil 36.</b> | c-Fos için immunohistokimyasal skorlama .....                                                   | 67 |
| <b>Şekil 37.</b> | Olig2 için immunohistokimyasal skorlama .....                                                   | 68 |
| <b>Şekil 38.</b> | BDNF için immunohistokimyasal skorlama.....                                                     | 68 |
| <b>Şekil 39.</b> | Grup K'den 7. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. ....             | 69 |
| <b>Şekil 40.</b> | Grup K'den 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. ....            | 70 |
| <b>Şekil 41.</b> | Grup D'nin 7. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü .....             | 71 |
| <b>Şekil 42.</b> | Grup D'nin 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. ....            | 71 |
| <b>Şekil 43.</b> | Grup S'nin 7. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....              | 72 |
| <b>Şekil 44.</b> | Grup S'nin 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....             | 73 |
| <b>Şekil 45.</b> | Grup SD'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....  | 74 |
| <b>Şekil 46.</b> | Grup SD'nin 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. ....           | 74 |
| <b>Şekil 47.</b> | Grup K'den 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....   | 75 |
| <b>Şekil 48.</b> | Grup K'den 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....  | 76 |
| <b>Şekil 49.</b> | Grup D'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....   | 77 |
| <b>Şekil 50.</b> | Grup D'nin 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....  | 77 |
| <b>Şekil 51.</b> | Grup S'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....   | 78 |
| <b>Şekil 52.</b> | Grup S'nin 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....  | 79 |
| <b>Şekil 53.</b> | Grup SD'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü.....  | 80 |
| <b>Şekil 54.</b> | Grup SD'nin 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik<br>görünümü..... | 80 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                                |                                           |
|--------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : Tümör nekroz faktör- $\alpha$           |
| <b>IL-6</b>                    | : İnterlökin-6                            |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | : İnterlökin-1 $\beta$                    |
| <b>ROT</b>                     | : Reaktif oksijen türleri                 |
| <b>VDR</b>                     | : Vitamin D reseptörü                     |
| <b>GABA</b>                    | : Gama-aminobütirik asit                  |
| <b>GABA-A</b>                  | : Gama-aminobütirik asit tip A            |
| <b>MAK</b>                     | : Minimum alveolar konsantrasyon          |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | : Nükleer Faktör kappa B                  |
| <b>FiO<sub>2</sub></b>         | : Solunan oksijen fraksiyonu              |
| <b>NO</b>                      | : Nitrik oksit                            |
| <b>NOS</b>                     | : Nitrik oksit sentaz                     |
| <b>İnos</b>                    | : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz      |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | : İnterferon gamma                        |
| <b>DBP</b>                     | : Vitamin D bağlayıcı protein             |
| <b>BDFN</b>                    | : Beyin kaynaklı nörotrofik faktör        |
| <b>Bcl-2</b>                   | : B Hücreli Lösemi/Lenfoma 2              |
| <b>Bax</b>                     | : Bcl-2 ile ilişkili X proteini           |
| <b>APAF-1</b>                  | : Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör   |
| <b>Trk</b>                     | : Tropomiyozin ile ilgili kinaz           |
| <b>Olig2</b>                   | : Oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2 |
| <b>İH</b>                      | : İmmünohistokimya                        |
| <b>EM</b>                      | : Elektron mikroskobu                     |
| <b>ip</b>                      | : İntraperitoneal                         |
| <b>OPC</b>                     | : oligodendrosit öncü hücre               |
| <b>NSC</b>                     | : Nöral kök hücre                         |
| <b>ml</b>                      | : Mililitre                               |

## ÖZET

### **Gebelik Sırasında Sevofluran Anestezisi Uygulanan Farelerin Yavrularında Ortaya Çıkacak Nörotoksisite, Nöroinflamasyon ve Duygusal Davranışlarda Vitamin D'nin Etkileri**

**Amaç:** Gebelik sırasında genel anestezi uygulanan annelerin bebeklerinde sevofluranın neden olduğu nörotoksisite, nöroinflamasyon ve duygusal davranış değişikliklerine vitamin D'nin nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkilerini incelemeyi amaçladık.

**Yöntem:** 8 haftalık 20 adet swiss albino türü gebe fare her grupta 5 adet olacak şekilde kontrol (Grup K), D vitamini (Grup D), sevofluran (Grup S), sevofluran-D vitamini (Grup SD) olarak 4 gruba ayrıldı. Grup S ve Grup SD'ye gebeliğin 14. gününde 2 saat boyunca 6 L/dk %97 O<sub>2</sub> ile %3 sevofluran inhale ettirildi. Grup K ve Grup D'ye gebeliğin 14. gününde 2 saat boyunca 6 L/dk %100 O<sub>2</sub> inhale ettirildi. Gebelik boyunca Grup D ve Grup SD'ye 5mcg/kg dozunda vitamin D, Grup S ve Grup K'ya 1mililitre (ml) salin intraperitoneal (ip) olarak verildi. Graplardan doğan yenidoğan fareler çalışmaya alındı. Her gruptan 12'şer adet yavru fareyi doğum sonrası 7. ve 45. gün davranış testine almadan prefrontal korteks ve hipokampus doku kesitleri elektron mikroskopik (EM) yöntemle ve immünohistokimyasal (İH) yöntemle incelendi. İH yöntemle İnterlökin-6 (IL-6), Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), c-Fos, B Hücreli Lösemi/Lenfoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax), Oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2 (Olig2) ekspresyonları değerlendirildi. Her gruptan İH ve EM deneylerine alınmayan fareler 45. gün açık alan ve yükseltilmiş artı düzenek testine alındı.

**Bulgular:** Grup S'de Grup SD'ye göre prefrontal ve hipokampus dokularında Bax, IL-6, TNF- $\alpha$ , c-Fos ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı Bcl-2, Olig2, BDNF ekspresyonlarının anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. EM görüntüleri bu verileri destekledi. Gruplar arasında davranış testlerinde anlamlı fark bulunamadı.

**Sonuç:** Gebe farelere uygulanan sevofluranın yavrularında oluşturduğu nöroinflamasyon ve nörotoksisitenin vitamin D ile azaltılabildiğini tespit ettik.

**Anahtar kelimeler:** Sevofluran, vitamin D, IL-6, BDNF, Bax, TNF- $\alpha$ , c-Fos, Bcl-2, Olig2, EM

## ABSTRACT

### **Effects of Vitamin D on Neurotoxicity, Neuroinflammation and Emotional Behaviour in the Offspring of Mice Subjected to Sevoflurane Anaesthesia During Pregnancy**

**Objective:** We aimed to investigate the neuroprotective and anti-inflammatory effects of vitamin D on sevoflurane-induced neurotoxicity, neuroinflammation and emotional behavioural changes in offsprings of mice who underwent general anaesthesia during pregnancy.

**Method:** Twenty 8-week-old pregnant Swiss albino mice were divided into four groups with five mice each: control (Group K), vitamin D (Group D), sevoflurane (Group S), and sevoflurane-vitamin D (Group SD). On the 14th day of pregnancy, groups S and SD were exposed to 3% sevoflurane with 6 L/min of 97% O<sub>2</sub> for 2 hours. Groups K and D were exposed to 6 L/min of 100% O<sub>2</sub> for 2 hours on the same day.

Throughout the pregnancy, Group D and Group SD were given vitamin D at a dose of 5mcg/kg, while Groups S and K received 1 milliliter (ml) of saline intraperitoneally (ip). Newborn mice from the groups were included in the study. From each group, twelve mouse pups were taken and, without undergoing behavioral tests on the 7th and 45th days post-birth, tissue sections of the prefrontal cortex and hippocampus were examined by electron microscopy (EM) and immunohistochemical (IH) methods. The IH method assessed the expressions of Interleukin-6 (IL-6), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), c-Fos, B cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and Oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2). Mice not included in the IH and EM experiments from each group were subjected to open field and elevated plus maze tests on the 45th day.

**Results:** Bax, IL-6, TNF-  $\alpha$ , c-Fos, Bcl-2, Olig2, BDNF expressions were significantly increased and Bcl-2, Olig2, BDNF expressions were significantly decreased in Group S compared to Group SD in prefrontal and hippocampus tissues. EM images supported these data. No significant difference was found in behavioural tests between the groups.

**Conclusion:** We found that the neuroinflammation and neurotoxicity induced in the offspring of sevoflurane administered to pregnant mice can be reduced by vitamin D.

**Key words:** Sevoflurane, vitamin D, IL-6, BDNF, Bax, TNF-  $\alpha$ , c-Fos, Bcl-2, Olig2, EM

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi ve cerrahi alanlardaki ilerlemeler, küçük çocuklar için hayat kurtarıcı sonuçlar doğurmuş ve çocukların yaşam kalitesini artırmıştır. Ancak bu gelişmelere rağmen çocukluk döneminde genel anesteziye erken yaşlarda ve tekrarlı maruziyetle karşılaşma riski artmıştır(1). Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında, gelişmekte olan santral sinir sisteminde anestezi ajanlarının nörotoksitesi ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır(2). Preklinik çalışmalar; genç hayvanlarda anestezinin nörotoksiteye yol açtığını, öğrenme yeteneğini ve hafızayı olumsuz etkilediğini, ayrıca davranışsal ve duygusal farklılıklara neden olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, anestezi yönetimi ve çocuk hastaların tedavisi sırasında dikkate alınmalıdır(3). Ayrıca insan epidemiyolojik çalışmaları, genel anesteziye erken maruz kalmanın bilişsel ve davranışsal problemlerin artmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir(1).

Santral sinir sisteminin gelişiminde anestezinin indüklediği nörotoksite; nöronal apoptozis, nörodejenerasyon, nörogenezis ve sinaptogenezde değişiklikleri içermektedir. Bu yaygın nörodejenerasyonun yapılan çalışmalarda kanıtlanması ile Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi ve diğer kuruluşlar, çocuklarda hayati olmayan ameliyatların 3 yaşına kadar ertelenmesi ve bu alandaki araştırmaların yoğunlaştırılması yönünde bir öneride bulunmuştur(4). Özellikle ikinci trimesterde gerçekleştirilen obstetrik olmayan cerrahi ve fetal müdahale prosedürleri sırasında fetusun genel anesteziye maruz kalması endişe vericidir(5, 6).

Her yıl dünyada binlerce gebe kadın, obstetrik dışı ve fetal girişimler nedeniyle anestezi almaktadır(7). İkinci trimesterde beyin gelişimi, nörogenezis, nöral göç ve kortikogenezis gibi önemli nörogelişimsel olaylar başlar. Bu dönemde anneye uygulanan anestezikler, gelişmekte olan beyni etkileyebilir. Çünkü çoğu genel anestezi, lipofilik özellik taşır ve plasentayı kolaylıkla geçebilir. Ayrıca uterusu irrite etmemek ve erken doğum riskini en aza indirmek için genellikle yüksek konsantrasyonlarda anestezi ajan kullanılması gerekmektedir (~1,5 minimum alveolar konsantrasyon-MAK seviyesinde). Bugüne kadar yapılan araştırmalardan elde edilen

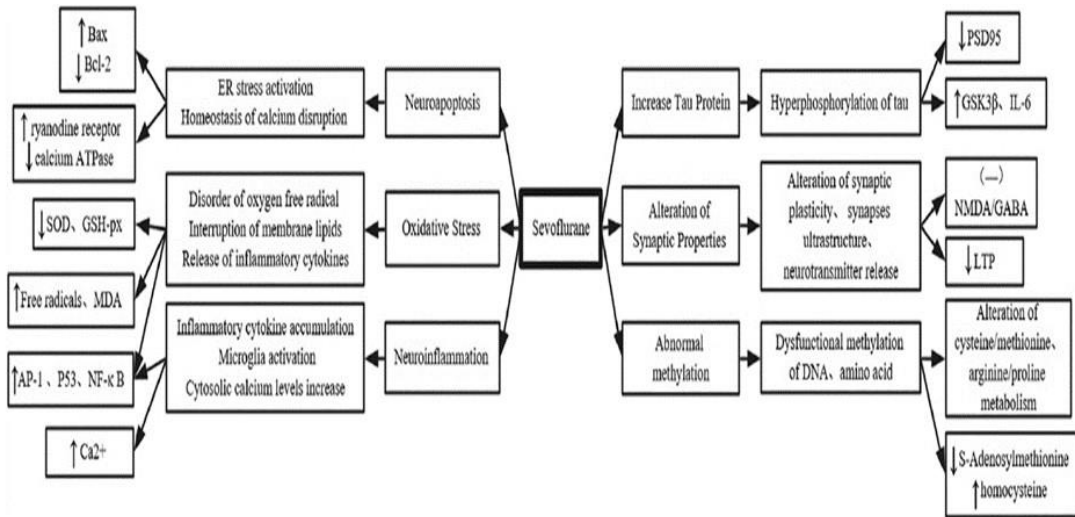
sonuçlara göre, gelişmekte olan fetusta sevofluranın toksisitesi ve bu etkinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır(8, 9).

Sevofluranın nörotoksik etkileri, serbest oksijen radikalleri ve hücrel hasarla ilişkilendirilmiştir. Bu oksidatif stresin ardından inflamatuvar madde salınımının artması, nörotoksik etkilere yol açabilir(10). Proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$ 'nin neden olduğu beyin farklı bölgelerindeki nöroinflamasyon ve mikroglia aktivasyonu, insanlarda ve hayvanlarda nörodavranışsal ve bilişsel işlev bozukluğa neden olabilir(11, 12).

İnhalasyon anestezikleri, endoplazmik retikulumun normal yapısı ve işleyişi için gerekli olan kalsiyum homeostazisini bozarak nöronal apoptozisi indükleyebilir(13-15).

Yenidoğan sıçanlarda sevoflurana maruz kalma ile hipokampustaki sinapsların ultrastrüktürel gelişimi etkilenerek hipokampal sinaptik yoğunlukta ve mitokondri içeren presinaptik terminallerin fraksiyonunda azalmalar olduğu gösterilmiştir(16, 17).

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak, klinik olarak annenin gebelik döneminde sevoflurana maruz kalması sonucunda oluşan fetal toksisite ile ilişkili patolojinin; oksidatif stres, nöroinflamasyon, nöroapoptozis ve sinaptik özelliklerin değişimini içerdiği düşünülmektedir(18).



Şekil 1. .Sevofluranın nöroinflamasyondaki etki mekanizmaları (8).

D vitamini eksikliği, öncelikle gebe kadınlarda olmak üzere tüm dünyayı etkileyen ve giderek ciddileşen bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir(19). Bir asır önce keşfedilmesinden bu yana D vitamini için çok sayıda pleiotropik etki rapor edilmiştir. Günümüzde, kalsiyum homeostazisi ve kemik metabolizmasındaki önemli rolüne ek olarak, antibakteriyel, anti-proliferatif, immünomodülatör ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinmektedir(20, 21). D vitamini eksikliğinde, IL-6 ve TNF- $\alpha$  dahil olmak üzere proinflamatuvar mediyatörlerin serum seviyelerinde artış meydana gelmektedir. Vitamin D, belirgin antiinflamatuvar etkisinin yansıra reaktif oksijen türlerine (ROT) ve nitrik okside (NO) karşı koruyucu etkiler gösterebilir ve oksidatif hasarı önleyebilir(21). Birçok çalışmada, vitamin D'nin beyinde oksidatif stresi ve nöroinflamasyonu azaltarak nöroprotektif faydalar sağladığı bildirilmiştir(22). Ayrıca Vitamin D reseptörleri (VDR) nörosteroidlerin nöroprotektif etkilerinde de rol oynamaktadır. Kalsitriolün VDR ekspresyonunu uyardığı, NADPHoksidaz2 'nin aktivitesini azalttığı ve hücrel apoptozis hızını inhibe ettiği gösterilmiştir(23). Bu durum VDR ile aktive olan ERK1/2 aktivasyonunun nöronal apoptozisin önlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir(24). Ayrıca vitamin D eksikliği mikroglia da önemli değişikliklere neden olmaktadır; bu değişiklikler, vitamin D eksikliğinde ile ilişkili duyuşal işlev bozukluklarında rol oynayabilir(25). İnsan beyni; prefrontal korteks, hipokampus, singulat girus, talamus, hipotalamus ve substantia nigra dahil olmak üzere çeşitli beyin bölgelerini etkileyen 1,25(OH) $_2$ D $_3$  üretir. 1,25(OH) $_2$ D $_3$  oksidatif stresi azaltır, inflamasyonu engeller, nöroproteksiyon sağlar, inflamatuvar mediatörleri azaltır ve nöronlardaki nörotrofinleri artırır(26).

Gebelik sırasında genel anestezi uygulanan annelerin bebeklerinde sevofluranın neden olduğu nörotoksisite, nöroinflamasyon ve duyuşal davranış değişikliklerinin vitamin D'nin nöroprotektif ve antiinflamatuvar özellikleri sayesinde engellenebileceğini öngörmekteyiz. Çalışmamızın amacı, intrauterin 2. trimesterde sevoflurana maruz kalan hayvanlarda gebelik döneminde anneye koruyucu vitamin D uygulamasının yavrularda ortaya çıkacak nörotoksisite, nöroinflamasyon ve duyuşal davranışlar üzerine etkilerini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Genel Anestezi

Genel anestezi, geçici bilinç kaybı ve refleks aktivitede azalma ile beraber vital fonksiyonlarda değişikliğin olmamasıdır. Genel anestezi kortikal merkezlerden başlayıp bazal ganglionlar, serebellum, medulla spinalis ve medüller merkezlerde depresyon sonucu oluşur. Reflekslerin baskılanması, bilinç kaybı ve kas gevşemesi genel anestezinin önemli bileşenleri olup üçü birlikte genel anestezi triadını oluşturmaktadır(27, 28).

Genel anestezikler, merkezi sinir sisteminde inhibitör nörotransmitterleri artırarak ve uyarıcı nörotransmitterleri azaltarak santral sinir sisteminde yaygın depresyona neden olurlar. Fakat genel anesteziklerin mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Genel anestezi, her biri farklı reseptörler ve nöronal yollar aracılığıyla iletilen çeşitli bileşenleri (amnezi, bilinçsizlik, analjezi ve hareketsizlik) içerir. Son zamanlarda, nörotransmitter ve voltaj kontrollü iyon kanalları, genel anesteziklerin en olası moleküler hedefleri olarak öne çıkmıştır. Gama-aminobütirik asit tip A reseptörleri, genel anesteziklerin başlıca hedefleri olarak öne çıkmaktadır. (29).

Anesteziye uygulamasında ilaçlar en sık intravenöz ve inhalasyon yoluyla verilir. Her ikisi de istenen kan konsantrasyonuna hızlı şekilde ulaşmayı sağlar(30).

Genel anestezinin seyri üç aşamada değerlendirilir:

- 1.İndüksiyon
- 2.İdame
- 3.Derlenme

İnhalasyon anestezikleri özellikle de sevofluran intravenöz yolun sağlanmasının zor olabileceği pediatrik popülasyonun indüksiyonu sırasında oldukça kullanışlıdır.

Yaştan bağımsız olarak anesteziye idame sıklıkla inhalasyon ajanlarıyla sağlanır(31).

### 2.1.1. İnhalasyon Anestezisi

İnhalasyon anesteziikleri 150 yılı aşkın bir süredir klinik anestezinin bir parçasıdır. Bu süre boyunca kullanılan maddeler daha da geliştirilerek ideal anesteziik ajana ulaşmaya çalışılmaktadır. Bu gruptaki bazı maddeler, yan etki profilleri nedeniyle artık yalnızca tarihsel değere sahiptir. 1950'lerde organik flor bileşiklerinin kimyasına ilişkin araştırmalar, günümüzde halojenlenmiş etil metil eter olarak yaygın şekilde kullanılan modern inhalasyon anesteziiklerin geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur.

İnhalasyon anesteziikleri, genellikle gaz formundaki anesteziik maddelerdir. Akciğerlere inhalasyon yoluyla alındıktan sonra kanda çözünerek etki gösterirler. İlk olarak 1847'de eter kullanılarak inhalasyon anestezisi uygulanmıştır. Ancak günümüzde artık eter kullanılmamaktadır. Kimyasal açıdan, çoğu modern inhalasyon anesteziikleri halojenli etil metil eterlere aittir. Bu bağlamda kullanılan halojen, genellikle florürdür(32).

İnhalasyon anesteziikleri, inhalasyonla akciğere alınır. Daha sonra alveol kapiller membrandan geçer ve kanda çözünerek merkezi sinir sistemine ulaşır ve anesteziiyi indükler(32).

Anesteziik gazların göreceli etkililiklerini karşılaştırmak için kabul edilmiş bir ölçü olan minimum alveolar konsantrasyon (MAK), hastaların %50'sinin cerrahi uyarana karşı hareketsizliğini sağlayan alveolar konsantrasyondur. MAK değeri inhalasyon anestezisinin potentini verir ve nitroz oksit en az etkili olan anesteziik gazlardandır(33).

İdeal inhalasyon anestezisinin özellikleri aşağıdaki gibi olmalıdır(32):

- \* Kimyasal saflık ve stabiliteye sahip olmalıdır.
- \* Vücutta metabolize olmamalıdır.
- \* Organ-spesifik toksik etki taşımamalıdır.
- \* Hızlı indüksiyon ve eliminasyon sağlayacak olan düşük kan/gaz partiyon katsayısı olmalıdır.
- \* Oksijen ve Nitroz oksit ile birleştğinde yanıcı ve patlayıcı olmamalıdır.
- \* Uzun vadede çalışanlar üzerinde olumsuz etkisi olmamalıdır.
- \* Hoş kokulu olması ve solunum yolları için irritan olmamalıdır.
- \* Vital fonksiyonlara minimal etkili olmalıdır.

- \* Analjezi sağlamalıdır.
- \* Merkezi sinir sistemindeki etkisinin kısa surede ortadan kalkmalıdır.
- \* Uygun fiyatlı olmalıdır.

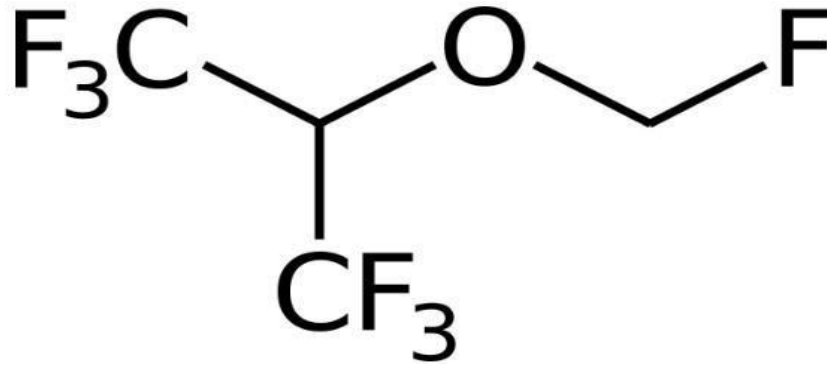
## 2.2. Sevofluran

Sevofluran, 1970'lerde sentezlenmesine rağmen, klinik kullanım için 1990'larda piyasaya sürüldü. Bu durum, kısmen pahalı sentezleme işlemi ve başlangıçta ortaya çıkan görünür toksik etkilerin endişesiyle ilişkilidir. Daha sonrasında toksik etkilerin korkulacak boyutlarda olmadığı ispatlanmıştır(34).

### 2.2.1. Fizikokimyasal özellikleri

Sevofluran renksiz, uçucu ve yanıcı olmayan inhalasyon anesteziğidir ve karakteristik bir kokuya sahiptir. Oda sıcaklığında stabildir ve kaynama noktası 58,6°C, buhar basıncı ise 157 mmHg'dır.

Sevofluranın yağ/gaz partisyon katsayısı 47,2'dir ve MAK'ı %2.05'tir. Bu nedenle, etkinliği halotan ve izofluran gibi eski inhalasyon ajanlarından daha düşüktür, ancak desflurandan yaklaşık üç kat daha etkilidir(35).



Şekil 2. Sevofluranın kimyasal yapısı

Baryum hidroksit ya da soda lime gibi (kalsiyum hidroksit buna dahil değildir) alkali karbon dioksit absorbanları sevofluranı nefrotoksik bir son ürüne indirger. Bu ürün compound A adı ile bilinen florometil-2,2-difloro-1-(triflorometil)'dir. Compound A birikimi, düşük akım anestezisi, kuru baryum hidroksit absorbanı, yüksek sevofluran

konsantrasyonu ve uzun anestezi süreleri ile artış gösterir. Compound A'nın insanlar üzerinde oluşturduğu bir yan etki yoktur(34).

### **2.2.2. Farmakodinamik özellikleri**

MAK değerleri yaşla birlikte azalır. Her on yılda yaklaşık olarak %6 oranında düşer. Örneğin, yenidoğanlarda bu değer %3,3 iken, bebeklerde ve genç yetişkinlerde %2,5, orta yaşlı yetişkinlerde %1,58 ile %2,05 arasında değişir ve 70 yaşından büyük yetişkinlerde %1,45 olarak kabul edilir(35).

Yetişkinlerde, %65 nitroz oksit içeren bir inspire edilen gaz karışımı, sevofluranın MAK değerlerini yaklaşık olarak %50 azaltır. Cinsiyet, sevofluranın MAK'ını etkilemez, fakat etnik faktörlerin bir rol oynayabileceğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır(34).

### **2.2.3. Farmakokinetik özellikleri**

Sevofluranın büyük kısmı (yaklaşık %95 - %98) akciğer aracılığıyla eliminasyona uğrar ve yaklaşık %2 - %5 ise karaciğer tarafından metabolize edilir ve bunun sonucunda inorganik florür ve organik florür metaboliti oluşur(35). Sevofluranın az bir kısmı glukuronik asitle konjuge edilir ve böbrekler aracılığıyla hızla atılır(34). Sevofluranın biyotransformasyonu çoğunlukla sitokrom P450 enzimleri (özellikle CYP2E1) aracılığıyla gerçekleşir(36).

Sevofluran uygulandıktan sonra serumdaki inorganik florür konsantrasyonları doza bağlı olarak değişir, uzun süreli maruziyetle 20 ila 90 µmol/L'ye kadar çıkabilir. Sevofluran anestezisi sonrasında çoğu çalışma nefrotoksik etkileri gösteremese de sevofluran kullanımı sonrasında hafif böbrek disfonksiyonuna dair bazı tartışmalı çalışmalar vardır(34, 37).

### **2.2.4. Organ sistemlerine etkileri**

**Solunum sistemine etkisi:** 1,5 ile 2,0 MAK arasındaki konsantrasyonlarda oluşan ventilasyondaki azalma apneye yol açabilir. Ventilasyonun azalması sevofluranın medullar solunum nöronlarının depresyonu ile ilişkilidir ve bunun sonucunda diyafragma kasının kontraktilesi bozulur(34, 36). Sevofluran, histamin veya asetilkolinin

salınmasıyla oluşan bronşiyal düz kas daralmasını azaltarak bronkodilatasyon yapar; bu nedenle astım hastalarında güvenle kullanılabilir.

Sevofluran, hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonu doza bağlı bir şekilde inhibe eder(34, 37).

**Kardiyovasküler sistem üzerine etkisi:** Sevofluran doza bağımlı olarak sistemik vasküler rezistans ve arteriyel kan basıncını düşürür.

Sevofluranın neden olduğu miyokardiyal kontraktilite depresyonu doza bağımlıdır. Miyokardiyal kontraktilite depresyon etkisi izofluran ile benzer ancak halotan ve enfluran'dan daha azdır(37).

Sevofluran kalp hızında çok az artış yapar ya da hiç yapmaz. Sevofluran QT süresini uzatabilir ama bu genellikle klinik öneme sahip değildir(34).

**Merkezi sinir sistemi üzerine etkisi:** Sevofluran serebral kan akımını ve intrakranial basıncı artırır. Bu, sevofluranın beyin ödemi artırabileceği anlamına gelir. Bu artış hiperventilasyonla engellenebilir(38). Sevofluranın düşük konsantrasyonlarında serebral otoregülasyon korunur, ancak daha yüksek dozlarda otoregülasyon bozulur(34). Sevofluran 1 MAK değerinde, serebral oksijen tüketimini yaklaşık olarak %50 azaltır(38).

Serebral metabolik oksijen tüketim hızı uyanık hastalarda 2,81 ml/100g/dak iken sevofluran anestezisinde 1,34 ml/100g/dak'dır; bu nedenle sevofluran serebral metabolizmayı azaltır(37).

### **2.2.5. Sevofluran ve nöroinflamasyon**

Sevofluran; düşük kan/gaz partision katsayısı, hızlı etki başlangıcı, solunum yolunu diğer gaz inhalasyonlarından daha az tahriş etmesi ve karakteristik keskin olmayan aromatik kokusu gibi özelliklere sahip olması nedeniyle en sık tercih edilen inhalasyon anesteziiklerinden biridir. Fakat yeni araştırmalar, sevofluran maruziyetinin bilişsel fonksiyonlar üzerinde potansiyel zararlı etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Sevofluran kaynaklı bilişsel bozukluğun en önemli mekanizması nöroinflamasyondur.

Nöroinflamasyonun nasıl oluştuğu hala tam olarak anlaşılamamıştır. Olası mekanizmalar arasında mikrogliyal fonksiyonun modülasyonu, kan beyin bariyeri hasarı,

bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler ve kolinerjik nörotransmisyonun iletiminin baskılanması yer almaktadır(39).

Mikroglia, santral sinir sistemindeki makrofaj hücreleri olarak tanımlanmıştır. Fakat yapılan son çalışmalarda, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, şizofreni, otizm ve Multiple Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur(40).

Bu nörodejeneratif hastalıkların ortak en önemli özelliklerden biri, mikroglia aracılı nöroinflamasyondur. Mikrogliaların iki farklı aktivasyonu vardır. Klasik aktivasyon (M1), proinflamatuardır. Nöroinflamasyonu ve doku hasarını artırır. Alternatif aktivasyon (M2), antiinflamatuardır. Doku onarımını ve yara iyileşmesini sağlar. Sevofluran, mikrogliaların proinflamatuvar M1 aktivasyonunu artırırken antiinflamatuvar M2 aktivasyonunu baskılar (41). Sevofluran mikroglial hücrelerde IL6'yı artırarak Nükleer Faktör kappa B (NF-kB) sinyal yollarını tetikler(42). NF- kB yolu nöroinflamasyon ve bilişsel gerileme ile ilişkilendirilir ve M1 tipi mikroglia aktivasyonunu tetikler(43). Sevofluran ayrıca kalsiyum salınımını artırarak NF-kB aktivasyonunu destekler(44, 45).

Sevofluran, kan beyin bariyerinin geçirgenliğini artırarak inflamatuvar mediatörlerinin merkezi sinir sistemine geçmesini artırabilir(46). Acharya ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı bir in vivo çalışmada; sevofluranın, beyne geçen immünoglobulin G artışı ile ilişkilendirildiği ve kan beyin bariyeri bütünlüğünün bozulmasına ve artan geçirgenliğe yol açtığını gözlemlenmiştir(47). Bazı çalışmalar, uzun süreli sevofluran maruziyetinin astrosit morfogenezini bozduğunu göstermektedir(48).

Sevofluran bağırsak mikrobiyotasını etkileyerek santral sinir sistemi dolaylı bir nöroinflamasyona neden olabilir(49). Han ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, klinik dozlarda kullanılan sevofluran konsantrasyonlarının (1.3 MAC için 4 saat) farelerde bağırsak mikrobiyotasını bozduğu gösterilmiştir(49).

Sevofluran, kolinerjik sinir iletimini baskılayarak proinflamasyonu arttırabilir(50). Sevofluranın klinik konsantrasyonda asetilkolin salınımını doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir(51). Yine Naruo ve arkadaşları, sevofluranın postsinaptik kolinerjik iletimi nikotinik asetilkolin reseptörlerini bloke ederek de baskılayabileceğini göstermiştir(52). Nikotinik asetilkolin reseptörleri, özellikle de alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptörü, nöroinflamasyonu önlemede önemli rol oynar(53).

### **2.3. Gebede Nonobstetrik Cerrahide Anestezi**

Kadınların yaklaşık %0,5-2'si hamilelik döneminde en az bir non-obstetrik cerrahi müdahale geçirmektedir ve bu sayı son yıllarda artarak devam etmektedir. En sık rastlanan nedenler; apandisit, over hastalıkları (torsiyon, neoplazma) ve travmadır(54).

#### **2.3.1. Gebelikteki fizyolojik değişiklikler:**

Kalp debisi genellikle gebeliğin 8 ila 10. haftalarında artmaya başlar. Kardiyak outputdaki bu artış hem kalp atış hızının hem de stroke volümünün artışına bağlı olarak meydana gelir(55). Gebelikte sistemik vasküler dirençte azalmadan dolayı kan basıncı düşer. Bunun sebeplerinden biri progesteronun neden olduğu vazodilatasyondur(6).

Termde hem kullanılan oksijen hem de dakika ventilasyon %50 artar. Artan ventilasyon, kısmi kompanse kronik solunumsal alkalozla sonuçlanır ve buna bağlı olarak pH 7,42-7,46 ve PaCO<sub>2</sub> 26-32 mmHg olur. Gebelerde fonksiyonel rezidüel kapasite azalmıştır. Bunu sebeplerinden biri büyüyen uterusun diyafragmayı yukarı eleve etmesidir(56). Fonksiyonel rezidüel kapasitesinin azalması artan oksijen tüketimi ile birleştiğinde apne dönemlerinde hipoksemi riskini artırır, bu durum genel anestezi indüksiyonu sırasında önemli hale gelir. Nazal ve orofaringeal mukozal kapiller yatak gebelikte vazodilatasyona uğrar, bu da o yapıları manipülasyonla kanamaya yatkın hale getirir. Bu sebepler maske ventilasyonu ve entübasyonu güçleştirir(6).

Kırmızı kan hücre kütleindeki artış plazma volümündeki artıştan göreceli olarak daha az olur. Bu da dilüsyonel anemiye neden olur. Gebeliğin 34. haftasında normal hematokrit değeri %31'e kadar düşebilir(6). Gebelik sırasında pıhtılaşma faktörleri VII, VIII, IX, X, XII, fibrinojen ile Von Willebrand faktörünün plazma seviyeleri artar ve sonuç olarak hiperkoagülopatiyeye yatkınlık oluşturur(57). Tromboembolik komplikasyonların insidansı gebelik sırasında en az 5 kat daha fazladır. Gebeler postoperatif dönemde venöz tromboz ve pulmoner emboli için çok yüksek risk altındadır(6).

Gebelik uterusun midenin pozisyonunu yukarı ve anteriora doğru bozması nedeniyle gastroözofageal sfinkter yetersizliğine neden olur. Bu durum pulmoner

aspirasyon riskini artırır(58). Glomerüler filtrasyon hızı yaklaşık olarak %50 artar ve bu nedenle serum kreatinin seviyeleri ve kan üre azotu değerleri azalır(57).

### **2.3.2. Anestezik ajanların teratojenik etkileri:**

İlaçların plasental transferi, plasentanın ilaçlara geçirgenliğine bağlı olarak üç kategoriye ayrılabilir(59):

Tip1: Plasentanın geçirgenliği yüksektir ve ilaç, anne kanından fetusa kolayca geçer. Bu kategoriye yağda çözünen tiyopentali örnek verebiliriz.

Tip2: Plasentanın geçirgenliği düşüktür, ancak ilaç yine de anne kanından fetusa geçer. Bu kategoriye ketamini örnek verebiliriz.

Tip3: Plasentanın geçirgenliği çok düşüktür ve ilaç, anne kanından fetusa çok az geçer. Bu kategoriye suda çözünen süksinilkolini örnek verebiliriz.

Plasental transfer, ilacın moleküler ağırlığı, lipofilitesi, iyonizasyon durumu ve plasentanın geçirgenliğini etkileyen diğer faktörlere bağlıdır.

İnhalasyon anestezikleri teratojenite ile ilişkilendirilmemiştir. Sevofluranın nörotoksisite etkilerini daha çok hipokampusta yaptığını gösteren çalışmalar mevcuttur(60). Nitrik oksit, vitamin B12 üzerinden metiyonin sentetaz enzimini inhibe ederek DNA sentezini ve miyelin üretimini etkiler(61). Anestezik maddeler beyin gelişimine olumsuz etkileri olabilir. Bu etkilerin düzeyi beyin gelişiminin aşamasına ve anestezik konsantrasyon ve süresine bağlıdır(62).

Klinik dozlarda propofol, etomidat, tiyopental veya ketaminin teratojenik etkileri yoktur ama ketamin erken gebelik döneminde oksitosik etkilere neden olabilir(63).

Kas gevşeticiler yüksek oranda iyonize olup düşük lipid çözünürlüğe sahip olduğundan, plasental transfer minimaldir(64).

### **2.3.3. Gebede Anestezi yönetimi:**

Anestezistin, anne ve fetusa güvenli anesteziyi sağlamak için hedefleri şunlardır(65):

- 1- Normal maternal fizyolojik fonksiyonu sürdürmek
- 2-Utero-plasental kan akışını ve oksijen transferini optimize etmek ve sürdürmek
- 3- Fetus üzerinde istenmeyen ilaç etkilerini önlemek
- 4- Myometrium uyarımını (oksitosik etkiler) önlemek 5- Genel anestezi sırasında farkında olma durumunu önlemek 6- Mümkünse bölgesel anestezi kullanmak.

Cerrahi işlemden mümkünse organogenezin tamamlandığı ilk üç ayda kaçınılmalıdır. Cerrahi işleme ihtiyaç duyulan acil durumlarda birinci öncelik anne hayatıdır. Anne hayatı tehdit altındaysa gebelik yaşı ne olursa olsun cerrahi işlem uygulanmalıdır(6).

Gebe hastalar da diğer hastalara benzer şekilde preoperatif olarak değerlendirilir. Bu değerlendirme tıbbi ve obstetrik öyküyü, fiziksel muayeneyi, hava yolunun değerlendirilmesini ve laboratuvar testlerine bakılmasını kapsar. Komplike olmayan gebelikte ek testlere gerek yoktur. Preoperatif değerlendirme; obstetrisyenlerle yakın iş birliğini, doğumun beklendiği durumlarda fetusun ultrason değerlendirmesini ve neonatologlara danışmayı içermelidir. Gebe hastalarda standart monitörizasyon yapılır fakat cerrahi türüne veya hasta komorbiditelerine bağlı olarak İleri düzeyde monitörizasyon, örneğin intra-arteriyel sürekli basınç izleme, uygulanabilir(65).

Gebelere, genel anestezi indüksiyonu sırasında ya da derlenme sırasında maske ventilasyonu ihtiyacı doğabilir, bu durumda aspirasyon riski artar(54).

Gebeliğin 18-20. haftasından sonra supin pozisyonda genişleyen uterusun vena kava inferiora bası yapması nedeniyle supin hipotansiyon sendromu meydana gelebilir. Bu durum sağ kalça altına bir kama yastık yerleştirilerek veya ameliyat masası sola doğru eğilerek önlenabilir(66).

İnhalasyon anestetiklerinin MAK değeri gebeliğin 8 ila 12 haftasında başlangıca göre yaklaşık %30 oranında azalır. İndüksiyonda kullandığımız intravenöz ilaçlar gebelikte daha düşük dozda verilmelidir(67).

Anestezik ajanlar, uterin kan akışı üzerinde minimal etkiye sahiptir ancak kardiyodepresan veya vazodilatatör etkiler nedeniyle hipotansiyona ve uteroplazental

hipoperfüzyona katkıda bulunabilir. Hipotansiyonu tedavi etmek için efedrin ve fenilefrin kullanılabilir. Fenilefrin refleks bradikardiye neden olabilir. Efedrin maternal kalp hızını artırır. Fetal metabolik aktivite ve düşük fetal pH değerleri ile ilişkilendirilmiştir. Nöroaksiyel bloğun yaygın komplikasyonu hipotansiyondur ve buna bağlı olarak uteroplesantal kan akışı azalır. Nöroaksiyel blokta kullanılan lokal anesteziyelere duyarlılık artmıştır(54).

Doğum yapan hastalarda anesteziye bağlı mortalitenin en sık sebebi solunumsal problemleridir. Gebe bir hastanın hava yolu kontrolü, hamile olmayan bir kadının hava yolu kontrolünden 8 kat daha zordur. Gebelik ilerledikçe, ödem nedeniyle orofaringeal çap da daralır(68). Gebeliğin solunum sistemine etkilerinden dolayı hipoksiye yatkındırlar. İndüksiyonda oluşabilecek hipoksiyi engellemek için preoksijenasyon uygulanmalıdır(69).

Mekanik ventilasyon ayarları gebeliğin normal fizyolojik kronik solunum alkalozunun koruyacak şekilde belirlenmelidir. CO<sub>2</sub> plasentayı oldukça kolay bir şekilde geçer bu yüzden gebeliğin 2. trimesterin ortasından sonra end-tidal karbondioksit hedefi yaklaşık olarak 30 ila 32 mmHg olmalıdır. Fetal oksijenasyon, anne ve fetus için kritiktir. Bu nedenle, anestezi sırasında en az % 50 Solunan oksijen fraksiyonu (FiO<sub>2</sub>) kullanılmalıdır(54).

## **2.4. Nöroinflamasyon**

İnflamasyon; hücrelerin veya dokuların maruz kaldığı yaralanma, enfeksiyon ve travmaya yanıt olarak ortaya çıkan biyolojik süreçtir(70). Nöroinflamasyon santral sinir sisteminde meydana gelen immün yanıtın yansımasıdır. Periferik inflamasyondan farklı olarak işin içinde mikroglia ve astrosit gibi hücrelerin de rolü vardır. Kan beyin bariyeri santral sinir sistemini periferik bağışıklık sisteminden tamamen ayıramaz. Kan beyin bariyerinde patolojik durumlar meydana geldiğinde geçirgenlikte artış meydana gelir(71).

### **2.4.1. Nöroinflamasyon oluşumundaki mekanizmalar:**

**Nöroinflamasyonda mikroglialının rolü:** Mikroglia, santral sinir sisteminde bulunan bağışıklık hücreleridir ve nöroinflamasyonda merkezi bir rol oynarlar. Mikroglia

myeloid öncül hücrelerinden meydana gelir. Santral sinir sistemindeki enfeksiyöz ya da travma durumlarında ilk savunma hattını oluştururlar. Nöroinflamasyonun ilk belirtisi mikroglia aktivasyonudur. Mikroglia doku hasarında, nörotoksin etkisinde, enfeksiyon ve yaralanma varlığında aktive olabilir. Bu durumda, mikroglia IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri, reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit (NO) salgılar(71). Bu ürünler nöroinflamasyon artışıyla nöronal hasara neden olabilirler. Santral sinir sistemi içindeki bağışıklık ve inflamasyonda önemli bir rol oynayan aktive olmuş mikroglia hücreleri, nörodejeneratif hastalıklarda da önemli rol oynar(72).

**Nöroinflamasyonda astrositin rolü:** Astrositler, santral sinir sistemindeki inflamasyonun önemli bir parçasıdır. Santral sinir sisteminde en sık bulunan glial hücre olan astrositler; nörotransmitter seviyelerini düzenleme, kan beyin bariyerini koruma ve nöronlara metabolik destek sağlama gibi çeşitli görevler üstlenirler(71). Yaralanma, enfeksiyon veya inflamasyon karşısında astrositler aktive olurlar. Aktivasyonları sonucunda astrositler; pro-inflamatuvar sitokinler, kemokinler ve diğer sinyal moleküllerini üretirler ve nöroinflamasyon yanıtına katkıda bulunurlar(73). Aktive olan astrositler hipertrofi ve proliferasyona sebep olurlar. Bu durum glial skarların oluşmasına ve nöronal işlev bozukluğuna katkıda bulunur(71).

**NF-kB aktifleşmesinin nöroinflamasyonda rolü:** Nöroinflamasyona neden olan etkenler mikroglia hücreleri uyarak NF- kB yolunu aktifleştirir. NF-kB'nin aktive edilmesi; pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile siklooksijenaz-2 gibi nöroinflamasyona neden olan tüm enzimlerin üretimini düzenler(74).

**Proinflamatuvar sitokinlerin nöroinflamasyonda rolü:** NF-kB yolunun aktifleşmesi apoptosiz ve nöroinflamasyonun düzenlenmesini sağlayan TNF-  $\alpha$  ve IL1 $\beta$  düzeyini artırır. Hipokampustaki nöronların apoptoz derecesi TNF-alfa, messenger (haberci) ribonükleik asit düzeyleri ile ilişkilidir(71, 75). TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  kan beyin bariyerinin bütünlüğünü bozarak kan beyin bariyerini daha geçirgen hale getirir. Bu durum lökositlerin beyine girmesine neden olur(76, 77).

**Reaktif oksijen radikallerinin nöroinflamasyonda rolü:** Makrofajlar ve mikroglialar inflamasyon durumunda aşırı düzeyde reaktif oksijen radikalleri üretir.

Meydana gelen oksidatif stres DNA hasarını tetikler. Bu durum santral sinir sisteminde bir çok hastalığı tetikleyebilir veya ilerlemesine sebep olabilir(78). Mitokondri oksidatif strese duyarlı olduğu için bu durumlarda mitokondride disfonksiyon meydana gelir. Bir çok santral sinir sistemi hastalığında (Huntington hastalığı, alkolle ilişkili demans, beyin iskemik hasarı) mitokondriyal hasar meydana gelir. Mitokondriyal disfonksiyonun düzeltilmesi bir çok nörodejeneratif ve metabolik hastalıklarının tedavisinde ana nokta olabilir(79, 80).

**Nitrik oksitin nöroinflamasyondaki rolü:** Bağışıklık sisteminde önemli rolleri olan NO'nın üretiminde 3 nitrik oksit sentaz izoformu vardır. Nöroinflamasyonda en önemli olan indüklenebilir iNOS'dur. Patolojik bir durum yoksa iNOS aktifleşmez(81). IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinler iNOS'u aktifleştirir. Aktifleşen NO nöronal apoptozu uyarır(82).

## **2.5. Apoptosis**

Nöronal apoptozis, gelişmekte olan beyni şekillendirir ve nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel olarak önemli bir rol oynar. Nöronlardaki apoptozis programının başlıca moleküler bileşenleri arasında apoptotik proteaz-aktive edici faktör 1(Apaf-1) ve Bcl-2 ile kaspaz ailelerine ait proteinler bulunur. Nörotrofinler, kritik protein kinaz kaskadlarının etkisiyle nöronal apoptozisi düzenler; bunlar arasında fosfoinozimid 3-kinaz/protein kinaz B ve mitojen-aktive protein kinaz yolları yer alır(83).

Nöronal apoptozis, memelilerde Bcl-2 protein ailesi, Apaf-1 adlı bir adaptör protein ve kaspaz adı verilen bir proteaz ailesi tarafından kontrol edilir. Bu proteinler, sırasıyla C. elegans hücre ölümü gen ürünlerinden CED-9, CED-4 ve CED-3 genlerinin karşılıklarıdır. Nöronlar da dahil olmak üzere tüm hücreler bu temel hücre ölümü programını kullanır. Ancak farklı nöron tipleri ve gelişim aşamalarındaki nöronlar, Bcl2 ve kaspaz proteinlerinin farklı türlerini kullanarak, hücre ölümünü düzenlemede özgül bir yol izlerler. Bu, nöronların ölümünün nasıl ve ne zaman gerçekleşeceğine dair özel bir kontrol sağlar(84).

Bcl-2 protein ailesi, hücre içi apoptotik sinyal iletiminde kritik bir rol oynar. Bu gen ailesi hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik proteinleri içerir(85). Bcl-2 ailesinin

başlıca anti-apoptotik üyeleri olan Bcl-2 ve Bcl-xL, mitokondriyal dış zar ve endoplazmik retikulum ile perinükleer zar üzerine yerleşmiştir(83). Bcl-2 ve Bcl-xL, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini heterodimerizasyon yoluyla inhibe ederek etki eder(85). Bax, sinir sisteminde yaygın olarak ifade edilen Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir(86).

Apaf-1, *C. elegans* hücre ölümü gen ürünü CED-4'ün memeli homologudur ve mitokondriyal hasardan kaynaklanan apoptotik sinyalleri aktive etmek için kaspazları aktive eder(87). Apaf-1, mitokondriyal salınan sitokrom c ile bir kompleks oluşturarak pro-kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Aktive edilen kaspaz-9, sırasıyla kaspaz-3'ü keser ve aktive eder(88). Kaspazlar büyük alt birim ve küçük alt birimden oluşan katalitik olarak inaktif proenzimler olarak ifade edilir. Kaspaz-8 ve kaspaz-10, CD95 ve TNF reseptörleri gibi ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla aktive edilir(89). Nöronal hücre ölümünde yer alan iki ana kaspaz, kaspaz-3 ve kaspaz-9'dur ve ikincisi ilkinin aktive eder(88).

Nörotrofinler Tropomiyozin ilişkili kinaz (Trk) reseptörlerini aktive eder ve bağlar. Bu reseptörler, içsel tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre yüzeyi reseptörleridir. Trk reseptörleri, sinir büyüme faktörü, BDNF, nörotrofin 3 ve nörotrofin 4 olmak üzere dört nörotrofin tarafından aktive edilebilen üç reseptör tirozin kinaz ailesidir. Nörotrofinler nöronal sağkalımı koordine eder(90, 91).

BDNF'nin transkripsiyonel düzenlenmesi karmaşıktır ve hem epigenetik kontrol hem de transkripsiyon faktörlerini içerir. BDNF, nöronal aktiviteye "talep üzerine" bir öncül olan pro-BDNF'den üretilir ve sekretuar yolak aracılığıyla taşınır ve işlenir. Olgun BDNF'nin etkileri, fosforilasyon kaskadlarını tetikleyen TrkB reseptörü aracılığıyla gerçekleşir; bu da protein sentezini, aksonal büyümeyi, dendritik olgunlaşmayı, kullanıma bağlı sinaptik plastisiteyi ve nöroproteksiyonu teşvik eder. BDNF ayrıca mikrogliadan salınabilir ve santral sinir sistemindeki inhibitör nörotransmisyonu çift yönlü olarak etkileyebilir. Epigenetik kontroldeki, taşımada veya BDNF'nin sinyalizasyonundaki bozukluklar; Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, Spinoserebellar Ataksi tip 6, nöropatik ağrı, Rett sendromu, depresyon, şizofreni ve uyuşturucu bağımlılığı dahil olmak üzere çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozukluklara katkıda bulunabilir(92).

Olig2, bir temel heliks-döngü-helix transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü miyelin üreten oligodendrositlerde ve oligodendrosit progenitörlerinde belirgin bir

ekspresyon gösterir. Olig2, motor nöron ve oligodendrosit kaderlerinin seçiminde önemlidir. Bu faktör, nöral progenitör hücrelerinin ya çoğalmasını ya da farklılaşmasını sağlar(93). Olig2 ekspresyonu, nörodejeneratif hastalıkların seyrini etkileyebilir. Bazı durumlarda, oligodendrositlerin korunması veya fonksiyonlarının geri kazanılması için Olig2 ekspresyonunun arttırılması önemli olabilir. Bazı nörolojik durumlar veya inflamatuvar süreçler, oligodendrosit fonksiyonlarını etkileyebilir ve bu da Olig2 ekspresyonunda değişikliklere neden olabilir(93-95).

C-Fos proto-onkogendir. Aktivatör proteini 1 transkripsiyon faktörü kompleksinin bir üyesi olarak c-Fos proteini; hücre çoğalması, farklılaşma ve dönüşüm gibi süreçlerde anahtar bir molekül olarak rol oynar. Normal gelişim ve hücreSEL büyüme rolünün yanı sıra c-Fos proteini, antiproliferatif koşullar ve hücreSEL yaralanma sonucu indüklenen apoptotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir. Ancak c-Fos'un apoptozdaki nedensel rolüne dair doğrudan bir kanıt sunulmamıştır(96).

## **2.6. D Vitamini**

Vitamin D steroid yapılı bir prohormondur. Güneş ışığı sayesinde ciltte üretilen veya besinlerden alınan D vitamini, 1,25 dihidroksi vitamin D (kalsitriol) adlı bir hormon için hammadde görevi görür. Sağlıklı insanlarda D vitamininin çoğu, cildin alt epidermal bölgesindeki 7-dehidrokolestrolün fotokimyasal üretimini ile üretilir. Ultraviyole B ışınları cilde ulaştığında, 7-dehidrokolestrola enerji verir ve vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol) üretilir. Bu daha sonra bir sitokrom tipi 25-hidroksilaz enzimi (CYP27A1) tarafından 25 hidroksivitamin D'ye dönüştürülür. 25-hidroksivitamin D böbreğe ulaşır, burada başka bir sitokrom tipi 1 alpha-hidroksilaz enzimi (CYP27B1) onu aktif 1,25 dihidroksi vitamin D (kalsitriol) haline getirir(97). Parathormon proksimal renal tübül hücrelerde bulunan 1 alpha-hidroksilaz enziminin aktivitesini etkileyerek vitamin D metabolizmasını etkiler(98).

Vitamin D'nin etkilediği hedef hücrelerin hemen hemen hepsinde aktif vitamin D'yi inaktive eden 24-hidroksilaz enzimi bulunur. 24-hidroksilaz enziminin etkinliği fosfat tarafından artırılırken parathormon tarafından azaltılır(99).

Vitamin D türevleri suda düşük çözünürlüğe sahiptirler ve dolaşımında plazma proteinlerine bağlı taşınmaları gerekir. Vitamin D türevlerinin çok büyük kısmı Vitamin D bağlayıcı protein (DBP) olmak üzere albümin ve lipoproteinlerle de taşınır(100). DBP, aktif vitamin D bileşiklerinin serbest seviyelerini dengeleyerek, vitamin D zehirlenmesine karşı korur(98).

D vitamini, VDR aracılığıyla çeşitli fizyolojik süreçler için gerekli olan kandaki kalsiyum ve fosfat seviyelerini korumada önemli bir rol oynar. D vitamini, ince bağırsakta TRPV6 kanalları ve calbindin D gibi spesifik proteinleri indükleyerek kalsiyum alımını düzenler ve sonuçta kalsiyumun kana taşınmasını kolaylaştırır(98, 101).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , hem parathormon genini direkt etkileyerek hem de paratiroid bezlere etki eden kalsiyum seviyelerini düzenleyerek parathormon sekresyonunu kontrol eder(98).

Vitamin D hücre büyümesini baskılayabilmesi, apoptoz regülasyonu yapabilmesi, bağışıklık sistem modülasyonu yapabilmesi nedeniyle potansiyel olarak kanser hastalarında kullanılabilir(98). Multipl Skleroz, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların riski ve ilerlemesinin, düşük vitamin D seviyeleriyle bağlantılı olduğu düşünülüyor(102).

### **2.6.1. Vitamin D ve Nöroinflamasyon**

D vitamini eksikliği Multipl Skleroz, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıklarda hastaların genellikle sağlıklı bireylere göre daha düşük D vitamini seviyelerine sahip olduğu görülmüştür. Düşük D vitamini seviyeleri; demans, bilişsel bozukluk, motor becerilerinde bozulma ve hafıza kaybı gibi nörodejeneratif hastalıklarda olan belirtilerin olma riskini artırmaktadır. Araştırmalar D vitamini eksikliğin Parkinson hastalığında düşme ve denge sorunları ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Hayvan modelleri deneylerinde D vitamini takviyesi Multiple Skleroz modelinde hastalığın başlangıcını önleyebilmiş ve Alzheimer hastalığı modelinde öğrenme ve hafızayı iyileştirmiştir(102).

D vitamini, immünmodülatördür(103). Hemen hemen tüm bağışıklık hücreleri DVR'yi taşır ve bazıları aktif formunu lokal olarak üretebilirler. Bu sayede hem sistemik hem de lokalize bağışıklık düzenlemesini modüle eder(104). Multiple Sklerozda D

vitamini, dendritik hücrelerin gelişimini destekler. Dendritik hücreler, inflammatuar T hücrelerini baskılar ve düzenleyici T hücrelerini aktive eder(105). D vitamini T hücre farklılaşmasını etkiler, anti-inflammatuar fenotipleri destekler ve proinflammatuar fenotipleri inhibe eder. D vitamini, çeşitli bağışıklık hücrelerinden antikör üretimini ve pro-inflammatuar sitokin salınımını azaltır(102).

D vitamininin nöroprotektif özelliklere sahip olduğuna dair birçok kanıt vardır. Beyinde yaşlanma ve hücre ölümü ile bağlantılı olan L tipi kalsiyum kanallarının artan aktivitesini azaltır. Çalışmalar, bu kanalları aşağı regüle ederek nörotoksisiteyi önleyebileceğini göstermektedir(106, 107). Alzheimer hastalığında, D vitamini amiloid beta plaklarının temizlenmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bu, oksidatif stresi azaltır ve nöron hasarını önler(108, 109). D vitamini nöronal büyüme ve hayatta kalma için gerekli olan nörotrofik faktörlerin üretimini düzenleyerek, Alzheimer hastalığı hayvan modelinde nöronal sağkalımı artırdığı gösterilmiştir (110, 111).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Etik

Çalışmanın etik kurul onayı, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 28.03.2024 tarihli 3. oturumun 4 no'lu kararıyla alındı.

#### 3.2. Deney Hayvanlarının Bakımı

Deneylerde 8 haftalık 20 tane dişi swiss albino fare kullanıldı. Çalışmada kullanılacak dişi fareler erkek farelerle aynı kafese konulup çiftleştirildi ve ertesi gün gebeliğin 0. günü kabul edildi. Bu gebe farelerin yavruları çalışmaya alındı. Deney hayvanları barındırıldıkları odanın ısısı klima ile 20-23°C aralığında olacak şekilde ayarlandı. Odanın camları ışık geçirmeyecek şekilde boyanmış olup aydınlık-karanlık döngüsü otomatik olarak denetleyici bir cihaz ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde (05:00-17:00 aydınlık, 17:00-05:00 karanlık) ayarlandı. Deney hayvanlarının yemleri MBD Yem firmasından temin edildi, yemler herhangi bir kısıtlama olmadan (ad libitum) verildi. Tüm deney hayvanlarının su ihtiyaçları da herhangi bir kısıtlama olmadan çeşme suyu ile karşılandı.

#### 3.3. Deney grupları

Deney hayvanları rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Her gruptan doğan yenidoğan fareler çalışmaya alındı. Her gruptan 12'şer adet yavru fare doğum sonrası 7. ve 45. gün davranış testine alınmadan prefrontal korteks ve hipokampusleri izole edilerek EM yöntemle incelendi ve immünohistokimyasal yöntemle IL-6, BDNF, TNF- $\alpha$ , c-Fos, Bax, Bcl-2, Olig2 ekspresyonları değerlendirildi. Her gruptan immünohistokimya ve elektron mikroskopi deneylerine alınmayan fareler 45. gün anksiyete benzeri davranışların değerlendirildiği açık alan ve yükseltilmiş artı düzenek testine alındı.

**1.Grup: Grup S:** Sevofluran grubu olup gebelik boyunca her gün intraperitoneal 1ml salin verildi ve gebeliğin 14. gününde saat 09:00-11:00 aralığında fanus içinde 6 L/dk %97 O<sub>2</sub> ile %3 sevofluran uygulandı. Bu gebe farelerden doğan yavrular Grup S kabul edildi.

**2.Grup: Grup SD:** Sevofluran / D Vitamin grubu olup gebelik boyunca her gün intraperitoneal 5 mcg/kg vitamin D takviyesi yapıldı ve gebeliğin 14. gününde saat 09:00-11:00 aralığında fanus içinde 6 L/dk %97 O<sub>2</sub> ile %3 sevofluran uygulandı. Bu gebe farelerden doğan yavrular Grup SD kabul edildi.

**3.Grup: Grup D:** D Vitamin grubu olup gebelik boyunca her gün intraperitoneal 5 mcg/kg vitamin D takviyesi yapıldı ve gebeliğin 14. gününde saat 09.00-11:00 aralığında fanus içinde 6 L/dk %100 O<sub>2</sub> uygulandı. Bu gebe farelerden doğan yavrular Grup D kabul edildi.

**4.Grup: Grup K:** Kontrol grubu olup gebelik boyunca her gün intraperitoneal 1ml salin verildi yapıldı ve gebeliğin 14. gününde saat 09.00-11:00 aralığında fanus içinde 6 L/dk %100 O<sub>2</sub> uygulandı. Bu gebe farelerden doğan yavrular Grup K kabul edildi.

**Tablo 1. Deney Grupları**

| <b>DENEY GRUBU</b> | <b>UYGULAMA</b>                                                                                                                                                          |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GRUP S             | DAVRANIŞ BATARYASI(N=8)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (7. GÜN)<br>(N=6)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (45. GÜN)<br>(N=6) |
| GRUP SD            | DAVRANIŞ BATARYASI(N=8)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (7. GÜN)<br>(N=6)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (45. GÜN)<br>(N=6) |
| GRUP D             | DAVRANIŞ BATARYASI(N=8)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (7. GÜN)<br>(N=6)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (45. GÜN)<br>(N=6) |
| GRUP K             | DAVRANIŞ BATARYASI(N=8)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (7. GÜN)<br>(N=6)<br><br>HİPOKAMPÜS VE PREFRONTAL<br>KORTEKS İZOLASYONU (45. GÜN)<br>(N=6) |

### 3.4. Sevofluran Uygulaması

Anestezi uygulaması için deney hayvanları altışarlı gruplar halinde 3000 ml hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan indüksiyon kutusuna konuldu. İndüksiyon kutusuna vaporizatör ile 6 lt/dk akım hızında %97 oksijen içinde %3 konsantrasyonda Sevofluran (SevoraneR, Abbott Lab. İstanbul, Türkiye) girişi sağlandı. Farelere 2 saat süre ile gaz karışımı solutuldu. Anestezi derinliği solunum şekli hızı ve refleksleri kontrol edilerek takip edildi.

**Anestezinin sonlandırılması:** Sevofluran uygulaması iki saatlik sürenin sonunda kesildi ve 6 lt/dk akım hızında %100 oksijen verilerek farelerin derlenmeleri sağlandı. Gruplarına göre farelere aynı dozda anestezi ve oksijen uygulaması yapıldı.



Şekil 3. Sevofluran uygulaması

### 3.5. Vitamin D uygulanması

Grup D ve Grup SD'deki farelere intraperitoneal vitamin D (Devit-3 ® 300 000 I.U./ ml Ampul, DEVA Holding A.Ş./KOCAELİ) takviyesi 5mcg/kg dozunda gebelik süresince verildi. Grup K ve Grup S'deki farelere ise salin gebelik süresince verildi.

### 3.6. Davranış Bataryası

Doğum sonrası 42. gün yavru fareler 3 günlük adaptasyon döneminin ardından duygusal işlevlerin değerlendirildiği davranış testlerine alındılar. Davranış testleri olarak duygusal yanıtların değerlendirildiği açık alan testi ve yükseltilmiş artı düzenek testi yapıldı.

### 3.6.1. Açık Alan Testi

Çalışmamızda gruplar arasında lokomotor aktivite, stres ve anksiyete davranışları arasındaki fark değerlendirilmek için açık alan testi kullanıldı. Açık alan davranış test alanı kare, 60x60 cm<sup>2</sup> ölçülerinde olup; zemini siyah, duvarlar 24 cm yüksekliktedir. Düzenegin duvara komşu alanları perifer, diğer yerleri ise merkez alan olarak tanımlanmaktadır. Açık alan düzeneginde perifer alanlar, deney hayvanları için korumalı ve güvenli alanlardır. Merkez alan ise korumasız, anksiyetenin tetiklendiği alanlardır. Fareler doğal davranış yapıları gereği kendileri için güvenli olan perifer alanı tercih ederler ve anksiyetenin tetiklendiği merkez alandan kaçınırlar. Merkez alanda geçirilen süre, merkeze giriş çıkış sıklığı, merkezden geçme sıklığı ve merkeze girme latensi anksiyete ölçütleri olarak kabul edilir. Her denemeden sonra test alanı %10'luk etil alkol ile silinip kurulandı. Sonuçları değerlendirmek için alınan toplam mesafe, ortalama hız, merkeze, kenarlara, köşelere ilk giriş zamanları, frekansları, hareketli ve hareketsiz kaldıkları süreler bakıldı.

Davranış testi için laboratuvara getirilen farelerin 3 dakika süresince ortama alışmaları beklendi ve daha sonra teste alındı. Açık alan düzeneginin periferdeki kenarından düzeneğe bırakılan farelerin; düzenegin merkezinde geçirilen süre, düzenegin periferinde geçirilen süre, kat edilen mesafe ve merkezden geçme sıklığı davranışları 5 dakika süre ile video-kamera ile kayıtlanarak ETHOVISION XT (NOLDUS, sürüm 4.1) ile değerlendirildi. Merkeze ilk geçiş latensi ve ayağa kalkma sıklığı manuel olarak değerlendirildi. Düzenekte ortam sıcaklığı 24°C, ışık şiddeti 100 lux olarak ayarlandı.



Şekil 4. Açık alan düzenegi

### 3.6.2. Yükseltilmiş Artı Düzenek

Yükseltilmiş artı düzenek; yerden 40 cm yükseklikte, her biri 30 cm uzunluğunda iki açık kolu ve iki kapalı kolu olan, şeffaf pleksiglastan artı biçiminde yapılmıştır. Kapalı kolların etrafı 15 cm yüksekliğinde duvar ile çevrelenmiştir. Düzeneğin açık kollarında ışık 165 lux olacak şekilde ayarlanmıştır. Düzenek açık kol, kapalı kol ve merkez olmak üzere üç ana bileşen içermektedir. Açık kollar; anksiyetenin tetiklendiği, güvenli olmayan ortamdır. Fareler doğal davranış yapısı olarak açık koldan sakınıp kapalı kolu tercih etmektedirler. Açık kol aktivitesi anksiyete durumunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Farelerin duygusal durumu açık kol aktivitesi ve yeni ortama alışma ile değerlendirilmektedir.

Yükseltilmiş artı düzenek testi ile farelerde kalıtsal olan yükseklik korkusu ve yeni uzaysal uyaran ile tetiklenen anksiyete değerlendirilmektedir. Bu testte fareler yüzleri açık kola bakacak şekilde düzeneğin merkezine yerleştirildi. Açık kola girme latensi, açık kolda geçirilen zaman, kapalı kolda geçirilen zaman, açık kola giriş sıklığı, kapalı kola giriş sıklığı ve açık koldan aşağıya baş uzatma sıklığı davranışları 5 dk süresince video-kamera ile kayıtlanarak manuel olarak değerlendirildi.



Şekil 5. Yükseltilmiş artı düzenek

### 3.7. Elektron Mikroskobik Yöntemler

Elektron mikroskobik değerlendirme için alınan profrontal korteks ve hipokampus dokuları, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %5'lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra, üzerinde birkaç damla glutaraldehit olan dişçi mumuyla kaplı

petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat tespit edildi. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda iki defa 10'ar dk yıkandı ve ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik Osmium tetraoksit (OsO<sub>4</sub>) solüsyonuna alındı. 2 saat OsO<sub>4</sub> ile tespit edildi. Ardından dokular, Millonig fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika daha yıkandı. Daha sonra Tablo 2'de belirtildiği şekilde doku takip işlemleri uygulandı.

**Tablo 2. Elektron mikroskopik doku takip aşamaları**

|                                |                  |           |
|--------------------------------|------------------|-----------|
| %50'lik etil alkol             | +4°C'de          | 15 dakika |
| %70'lik etil alkol             | +4°C'de          | 15 dakika |
| %86'lik etil alkol             | +4°C'de          | 15 dakika |
| %96'lik etil alkol             | +4°C'de          | 15 dakika |
| %100'lük etil alkol            | +4°C'de          | 15 dakika |
| %100'lük etil alkol            | +4°C'de          | 15 dakika |
| %100'lük etil alkol            | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksit                 | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksit                 | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksit+Gömme materyali | Oda sıcaklığında | 15 dakika |
| Propilen oksit+Gömme materyali | Oda sıcaklığında | 15 dakika |

Bu işlemlerin ardından doku parçaları, Tablo 3'de içeriği ve miktarı belirtilen resin solüsyonu içerisine alındı ve 1 gece boyunca rotatorda karıştırıldı. Ertesi gün doku parçaları yeni hazırlanmış gömme materyali kullanılarak beem kapsüllere gömüldü ve 60°C'de etüvde 48 saat boyunca polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan ultramikrotom (Reichert Ultracut S Avusturya) ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70'lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile

kontrastlandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japonya) ile incelendi ve fotomikrograflar elde edildi.

**Tablo 3. Resin (gömme materyali) hazırlanışı**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Araldit (CY 212)                 | 20 ml  |
| Sertleştirici (HY 964)           | 20 ml  |
| Hızlandırıcı (DY 064)            | 0,6 ml |
| Plastikleştirici-Dibütil Fitalat | 1 ml   |

### **3.8. İmmünohistokimyasal Yöntemler**

Bax, Bcl-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, c-Fos, Olig2 ve BDNF aktivitesinin belirlenmesi amacı ile hipokampus ve profrontal korteksten elde edilen 5 mikron kalınlığındaki histolojik doku kesitleri, polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. +4°C’de bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutularak, bu işlemten sonra tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60°C’de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika bekletilerek deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda ısısında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH:6) içerisine alınıp 95°C’lik su banyosunda 30 dakika süreyle bekletilerek antijenlerin açığa çıkarılması sağlandı. Oda ısısında 45 dakika soğutulan kesitler, distile suda yıkandı ve endojen peroksidleri engellemek amacıyla %3’lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) içerisine alınarak 10 dk bekletildi. Kesitler, distile su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip kurulandıktan sonra, üzerine non-spesifik bağlanmayı engellemek amacıyla blocking solüsyonu (ab93705, Abcam, USA) damlatıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra kesitler, distile su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurulandı. Daha sonra 1/200 oranında dilüe edilen Bax (E-AB-13814, Elabscience, USA), Bcl-2 (E-AB-64075, Elabscience, USA), TNF- $\alpha$  (bs-10802R, Bioss, USA), IL-6 (bs-0782R, Bioss, USA), c-Fos (AF5354, Affinity, USA) ile 1/400 oranında dilüe edilen Olig2 (DF8004, Affinity, USA) ve BDNF (E-AB-18244, Elabscience,

USA) primer antikorları ayrı ayrı damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4°C’de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Primer antikorla muamele edilip 1 gece +4°C’de ve ardından 1 saat oda ısısında bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS’den geçirildi ve üzerlerine Biotin (ab93705, Abcam, USA) damlatılarak 15 dk süreyle oda ısısında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS’de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (ab93705, Abcam, USA) damlatılarak, 20 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS’den geçirilen kesitler üzerine, aminoetilkarbozol (AEC, ab93705, Abcam, USA) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Daha sonra çeşme suyu ile yıkandı. Doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilin ile 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, tekrar çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı yapıştırıcı madde damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preperatlar Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japonya) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

### **3.8.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi**

Bax, Bcl-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, c-Fos, Olig2 ve BDNF ekspresyonlarının araştırılması amacıyla fotoğrafları çekilen kesitlere immünohistokimyasal skorlama yöntemi uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama için x40’lık objektifte rastgele seçilen 10 farklı alanda H Skorlama sistemi kullanıldı. H skoru, pozitif hücre yüzdesiyle birlikte dört farklı boyama yoğunluğunun çarpımı toplanarak hesaplandı.

Bu sisteme göre;

Boyanma derecesi = 0 (Hiç boyanma yok)  
= 1 (Zayıf derecede boyanma)  
= 2 (Orta derecede boyanma)  
= 3 (Güçlü derecede boyanma) şeklinde değerlendirildi.

H Skor değerini hesaplamak için ‘I x PC’ formülü kullanıldı.

I: Intensity (Yoğunluk)

PC: Percentage of positive cells (Her derecede boyanan hücre yüzdesi)

Gruplar arasındaki ekspresyon farklılıklar Mann Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

### **3.9. İstatiksel Analiz**

Davranış testlerindeki sayısal ölçümler ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Normal dağılım göstermeyen sayısal ölçümleri ikiden fazla grup arasında genel karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanıldı. Bu karşılaştırmalarda anlamlı bulunan durumlar için grupların ikili karşılaştırılmalarında Bonferroni düzeltmesi yapılmış Mann Whitney U testi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alındı.

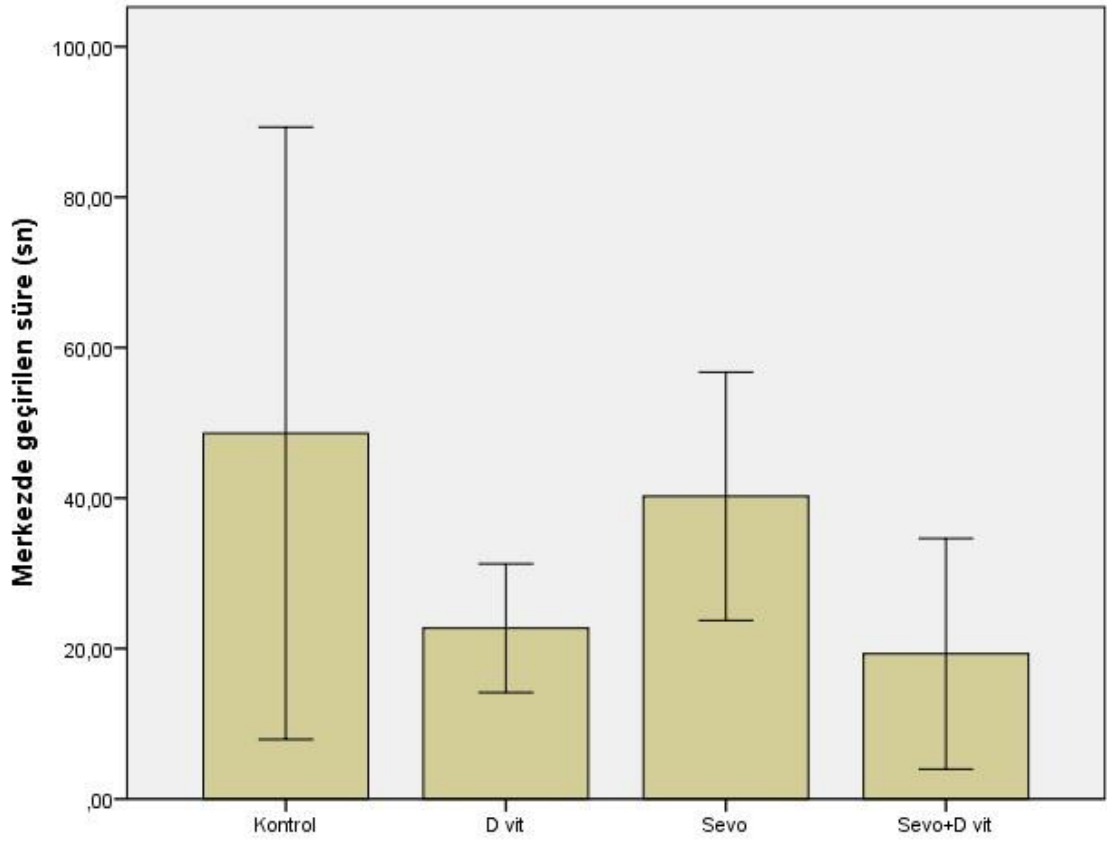
İmmünohistokimyasal çalışma verilerindeki sayısal ölçümler ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Normal dağılım göstermeyen bağımlı iki sayısal ölçümü karşılaştırmada Wilcoxon Signed Rank test kullanıldı. İkiden fazla grubun sayısal ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılmalarında grup içi varyansların homojen olup olmamasına göre Scheffe testleri kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

## 4. BULGULAR

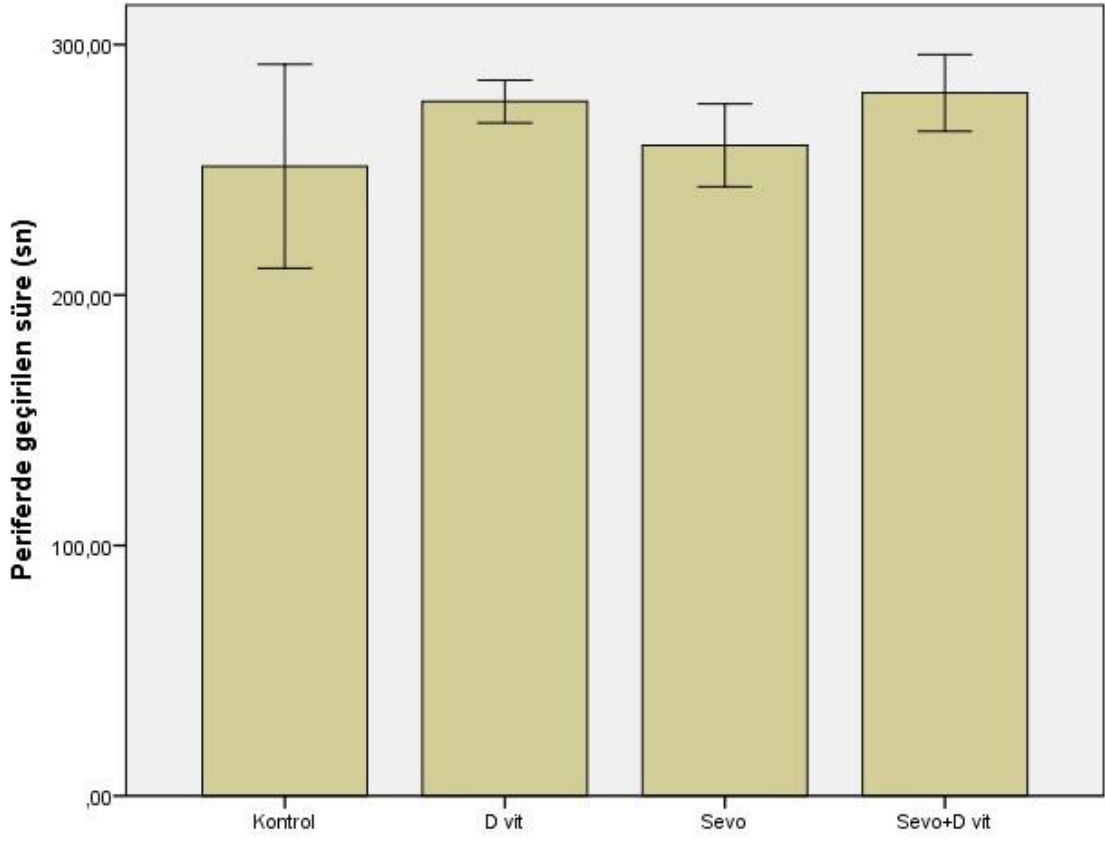
### 4.1. Duygusal Davranış Testi Bulguları

#### 4.1.1. Açık alan testi

Açık alan testinde merkez ve perifer alanda geçirilen sürede gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [ $H(3,32)=3,44$   $p=0,32$ ].

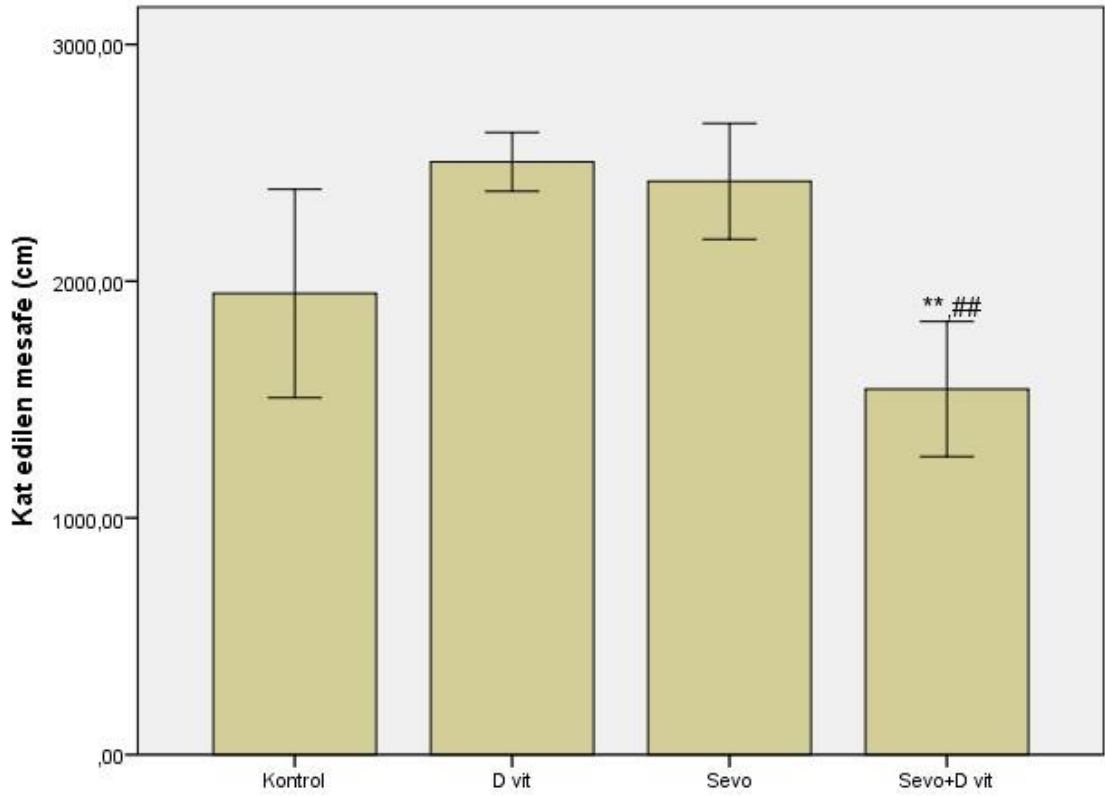


Şekil 6. Açık alan testinde merkez alanda geçirilen süre (sn). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda  $n=8$ ).



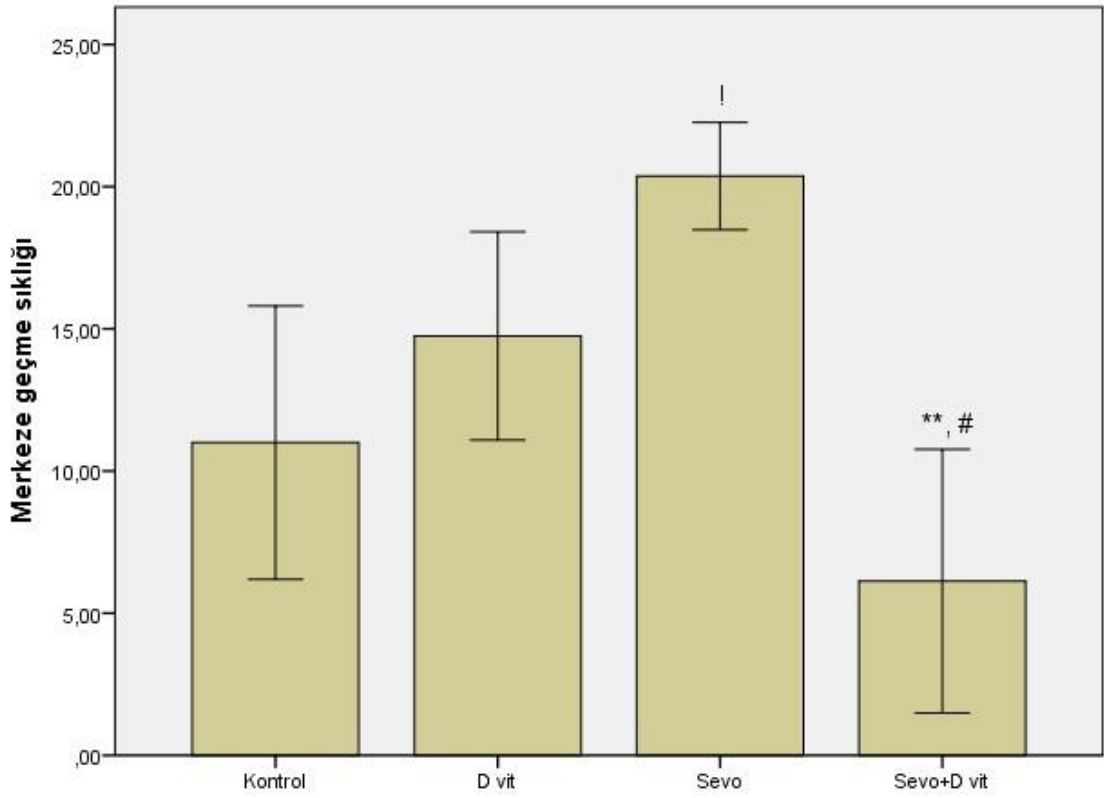
**Şekil 7. Açık alan testinde perifer alanda geçirilen süre (sn). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).**

Açık alan testinde kat edilen mesafede gruplar arasında anlamlı fark saptandı [H(3,32)=16,31 p=0,001]. Grup D’de Grup K’ye göre kat edilen mesafe anlamlı arttı (U=13,0 p=0,04). Kat edilen mesafe Grup SD’de GrupS ve Grup D’ ye grubuna göre anlamlı azaldı (U=0,0 p=0,001).



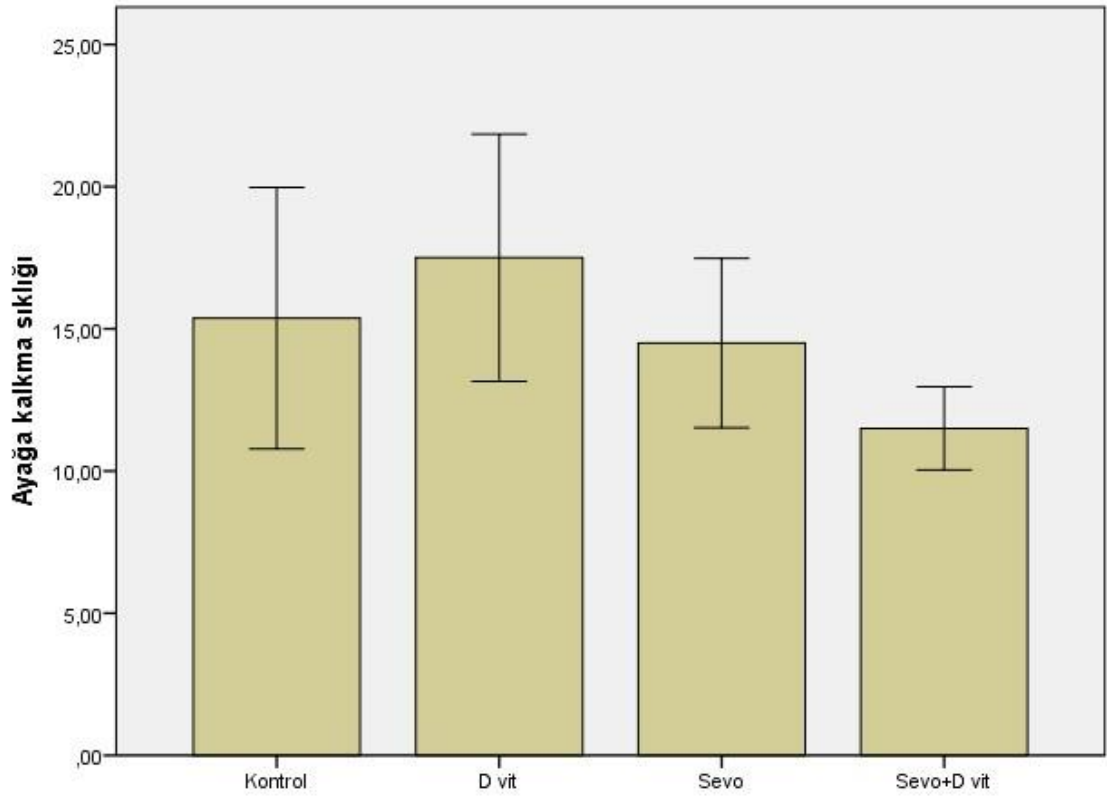
**Şekil 8. Açık alan testinde kat edilen mesafe (cm). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \*\* $p<0,01$  Sevo uygulanan gruba göre, ## $p<0,01$  D vit uygulanan gruba göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda  $n=8$ ).**

Açık alan testinde merkeze geçme sıklığında gruplar arasında anlamlı fark bulundu [ $H(3,32)=15,43$   $p=0,001$ ]. Grup S’de Grup K’ye göre merkez alana geçiş sıklığında anlamlı artış bulundu ( $U=2,5$   $p=0,01$ ). Grup SD’de Grup S ( $U=0,5$   $p=0,001$ ) ve Grup D’ye göre merkez alana geçme sıklığında anlamlı azalma saptandı ( $U=10,5$   $p=0,02$ ).



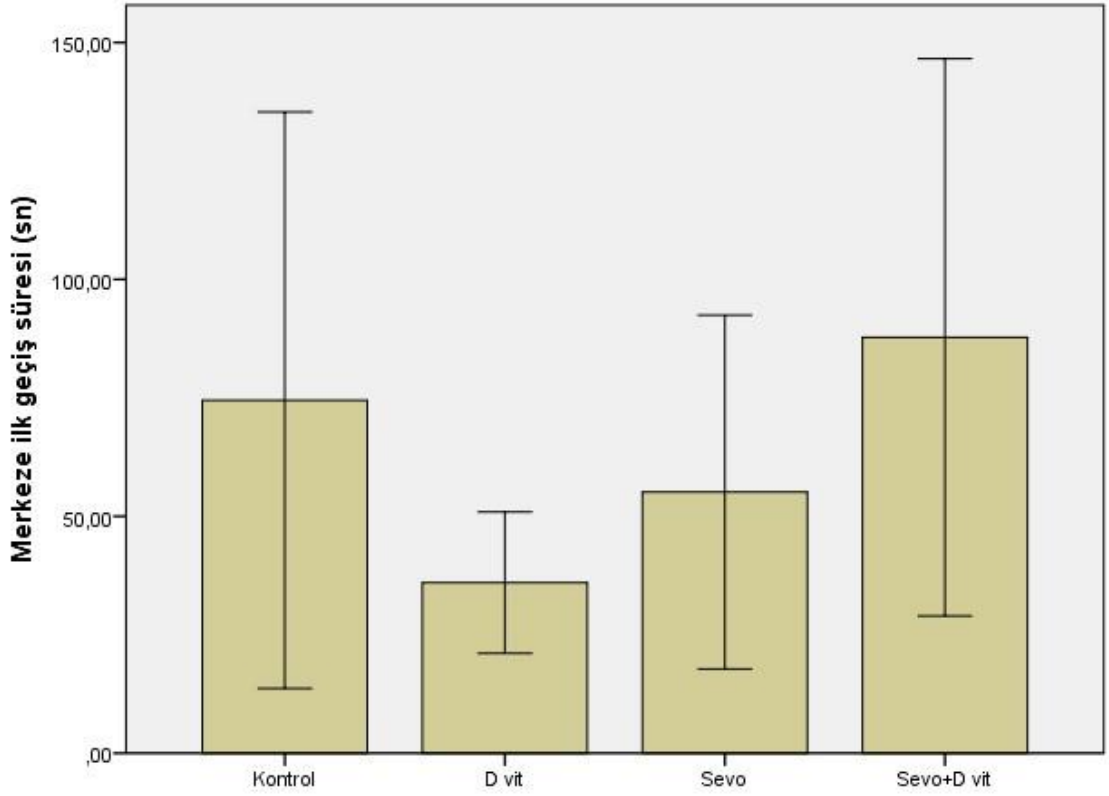
**Şekil 9.** Açık alan testinde merkez alana geçiş sıklığı. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ! $p<0,05$  kontrol grubuna göre, \*\* $p<0,01$  Sevo uygulanan gruba göre, # $p<0,05$  D vit uygulanan gruba göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda  $n=8$ ).

Açık alan testinde ayağı kalkma sıklığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [ $H(3,32)=4,80$   $p=0,18$ ].



**Şekil 10. Açık alan testinde ayağa kalkma sıklığı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).**

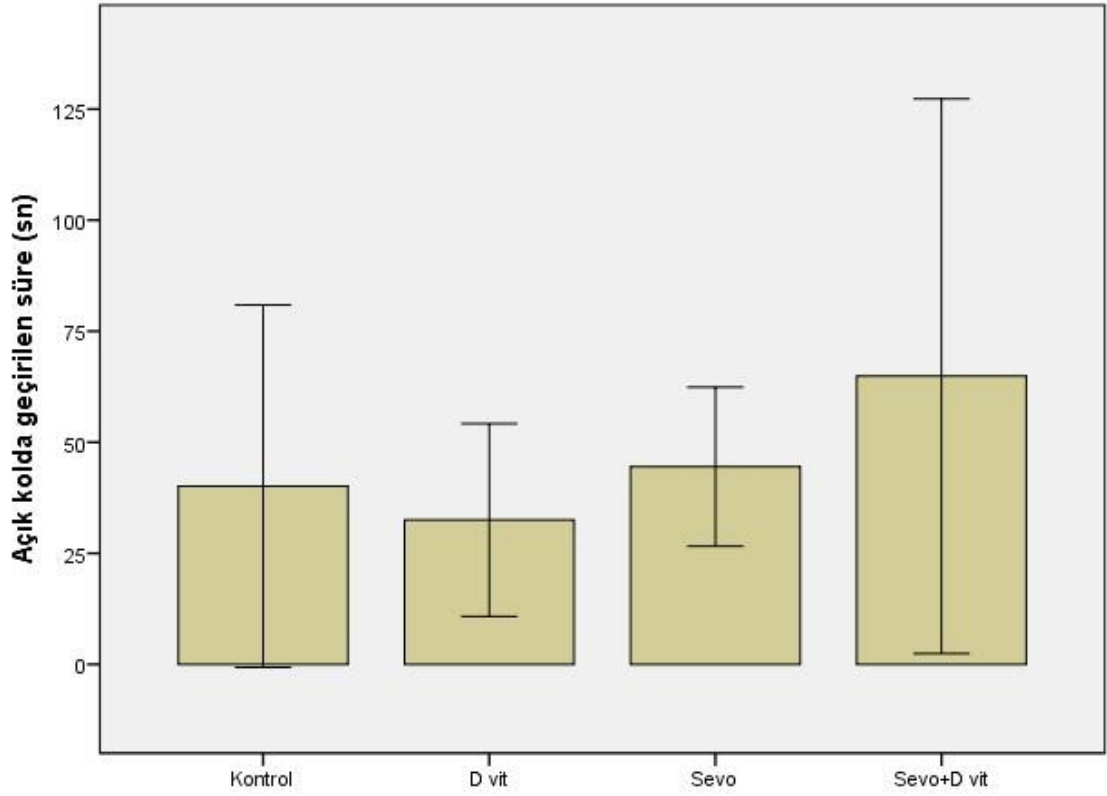
Açık alan testinde merkeze ilk geçiş süresi süresinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [ $H(3,32)=1,02$   $p=0,79$ ].



Şekil 11. Açık alan testinde merkez alana ilk giriş süresi (sn). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).

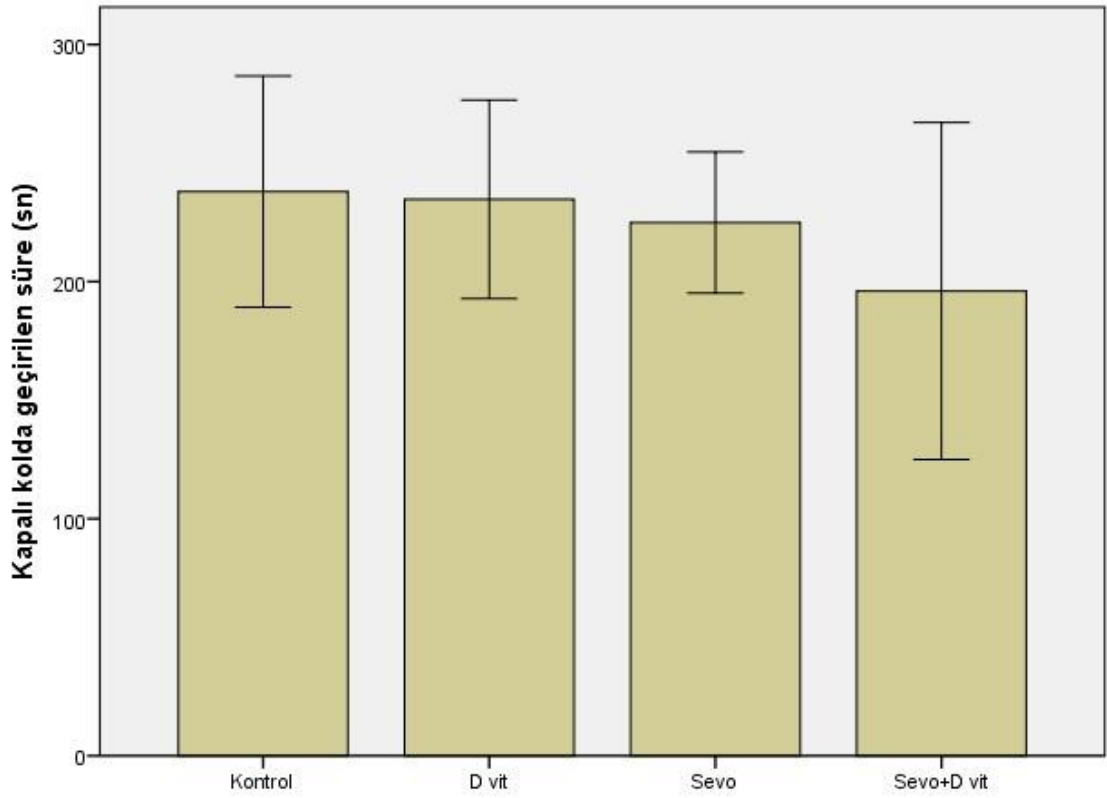
#### 4.1.2. Yükseltilmiş artı düzenek

Yükseltilmiş artı düzenekte açık kolda geçirilen sürede gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı [ $H(3,32)=1,57$   $p=0,66$ ].



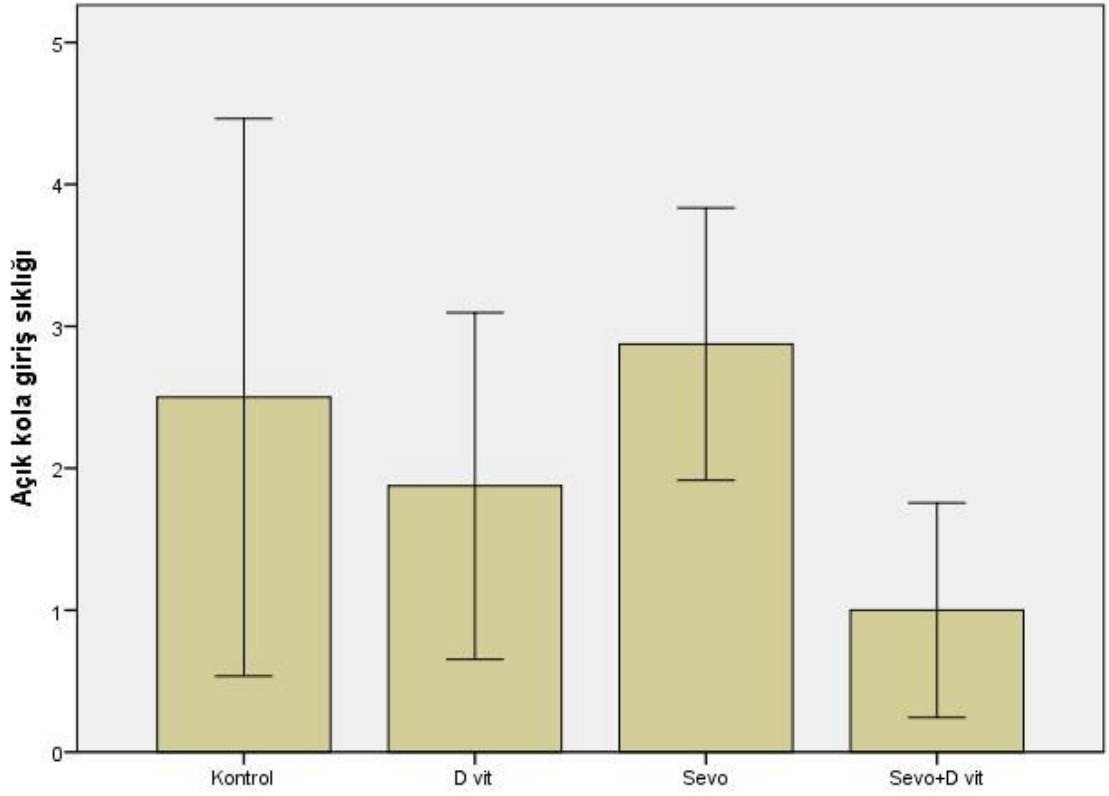
**Şekil 12. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kolda geçirilen süre (sn). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).**

Yükseltilmiş artı düzenekte kapalı kolda geçirilen sürede gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [ $H(3,32)=1,03$   $p=0,79$ ].



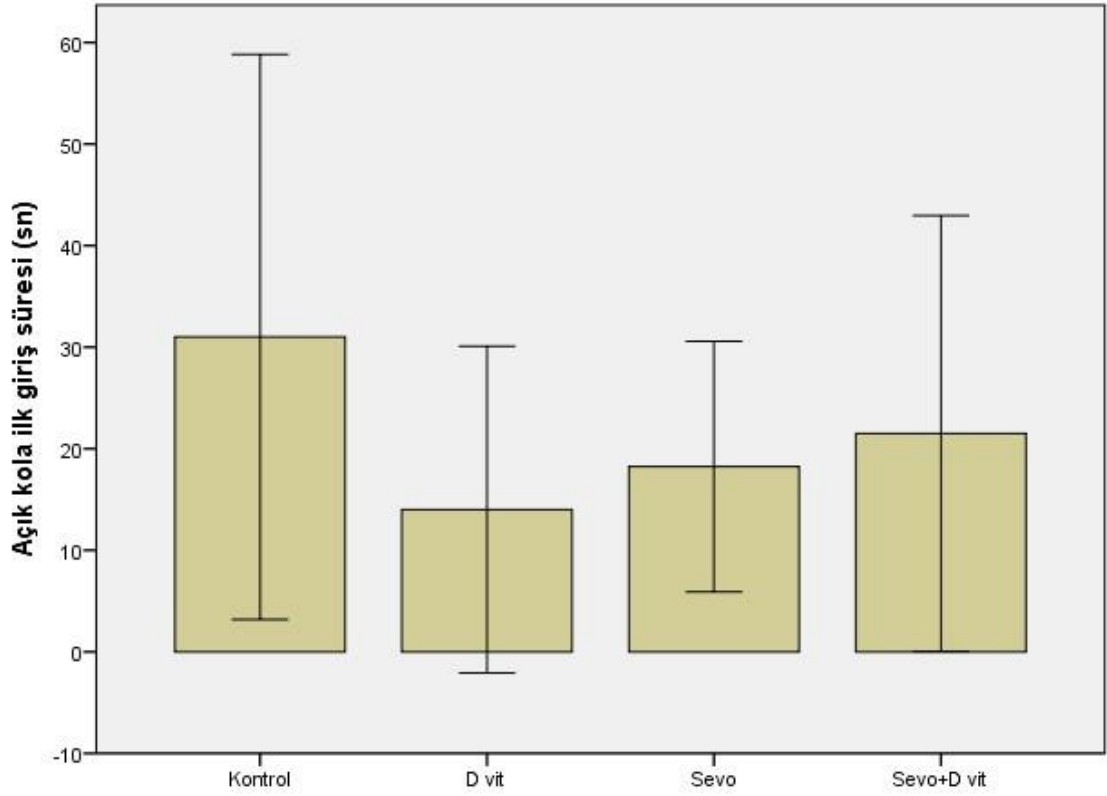
**Şekil 13. Yükseltilmiş artı düzenekte kapalı kolda geçirilen süre (sn). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).**

Yükseltilmiş artı düzenekte açık kola giriş sıklığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [ $H(3,32)=6,17$   $p=0,10$ ].



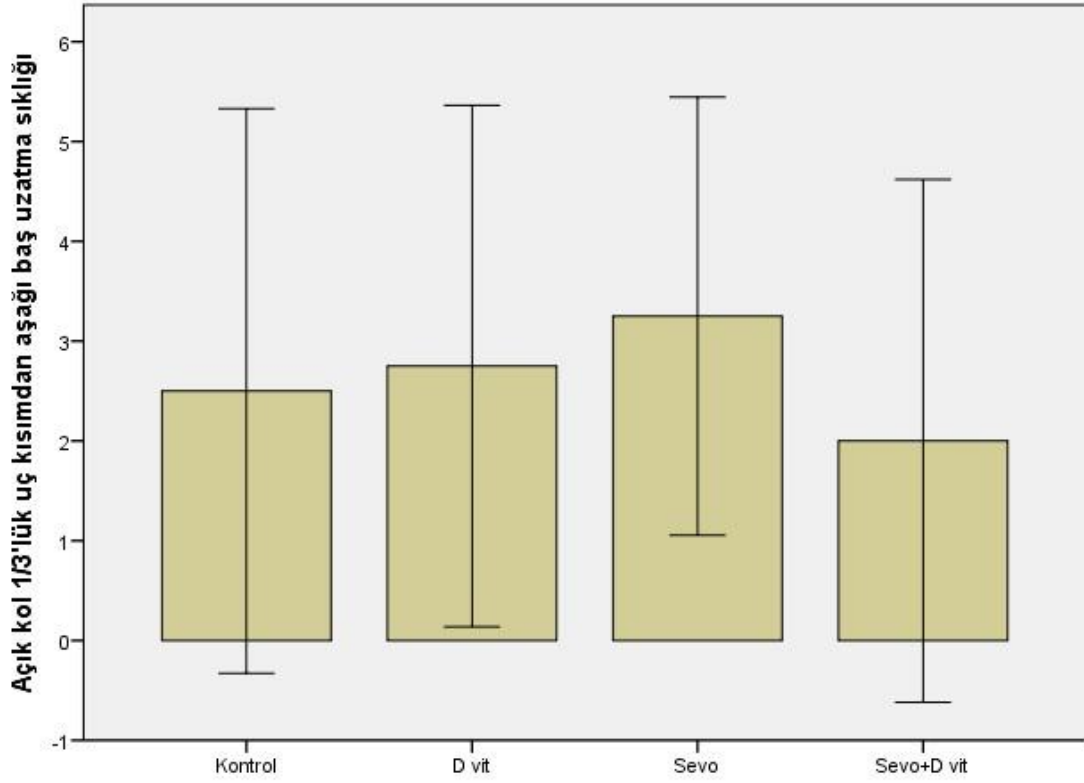
**Şekil 14. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kola giriş sıklığı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).**

Yükseltilmiş artı düzenekte açık kola ilk giriş süresinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı [ $H(3,32)=2,44$   $p=0,48$ ].



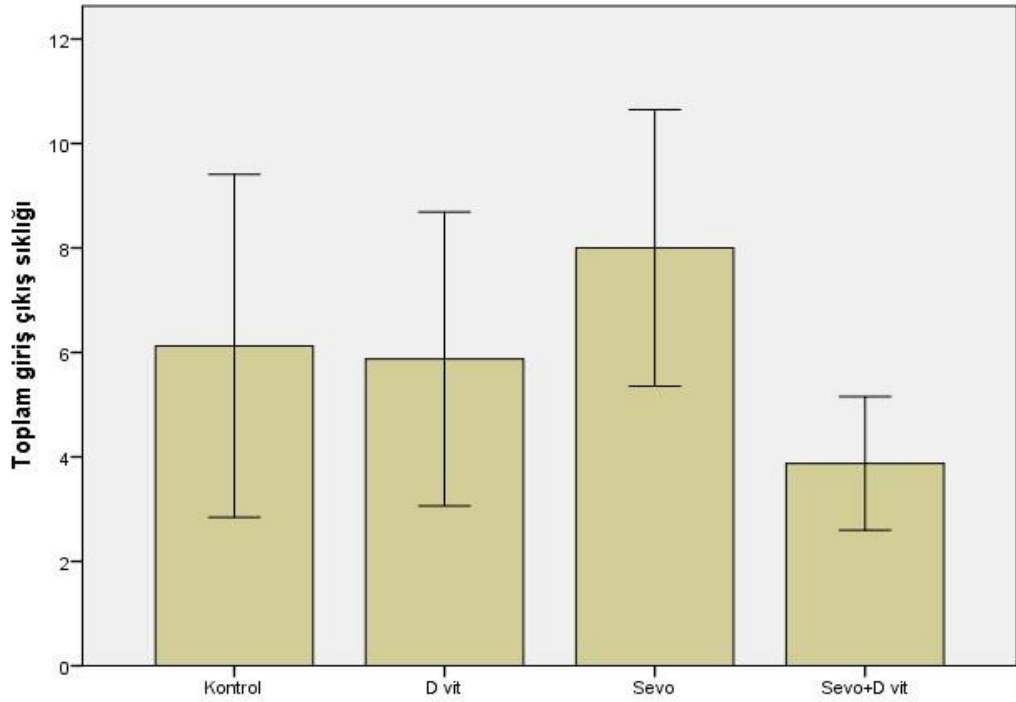
**Şekil 15. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kola ilk giriş süresi (sn). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).**

Yükseltilmiş artı düzenekte açık kolun 1/3'lük uç kısmından aşağı baş uzatma sıklığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı [ $H(3,32)=1,84$   $p=0,60$ ].



Şekil 16. Yükseltilmiş artı düzenekte açık kol 1/3 uç kısımdan aşağı baş uzatma sıklığı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).

Yükseltilmiş artı düzenekte açık ve kapalı kola toplam giriş çıkış sıklığında anlamlı fark saptanmadı [ $H(3,23)=7,03$   $p=0,07$ ].



Şekil 17. Yükseltilmiş artı düzenekte açık ve kapalı kola toplam giriş çıkış sıklığı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. (Gruplarda n=8).

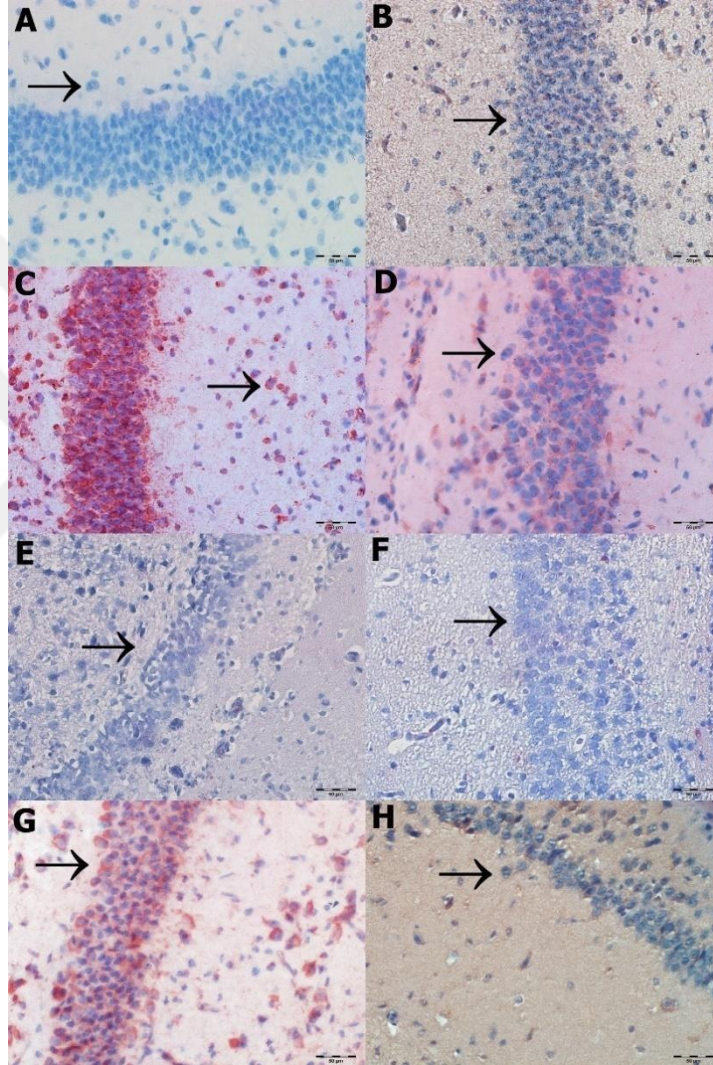
## 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

### 4.2.1. Hipokampus

#### 4.2.1.1. Bax İmmunohistokimyası

Grup K deneklerinden 7. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde, nöronlarda Bax immünreaktivitesinin zayıf düzeyde olduğu tespit edildi. (Şekil 18A). D vitamini grubundaki deneklerden 7. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde de nöronlara ait Bax immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre zayıf olduğu izlendi. Aynı zamanda perinöronal alanlarda da Bax pozitif immünreaktivite izlenmedi (Şekil 18B). Grup S'den 7. günde elde edilen hipokampus doku kesitlerinde, birçok nöron perikaryonunda ve perinöronal alanlarda güçlü pozitif Bax immünreaktivitesi görüldü (Şekil 18C). Grup SD'den 7. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde pozitif Bax immünreaktivitesinin Grup S'ye göre belirgin şekilde azaldığı dikkati çekti. Ancak Bax pozitif immünreaktivitesinin nöron perikaryonlarında devam ettiği tespit edildi (Şekil 18D).

Deneklerden 45. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde de Bax immunreaktivitesi değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K ve Grup D' de Bax immunreaktivitesinin zayıf düzeyde olduğu görüldü (Şekil 18E-18F). Grup S'de 45. günde güçlü pozitif Bax immunreaktivitesi dikkati çekti (Şekil 18G). Bununla birlikte Grup SD'de Bax immunreaktivitesinin zayıf olduğu belirlendi (Şekil 18H).

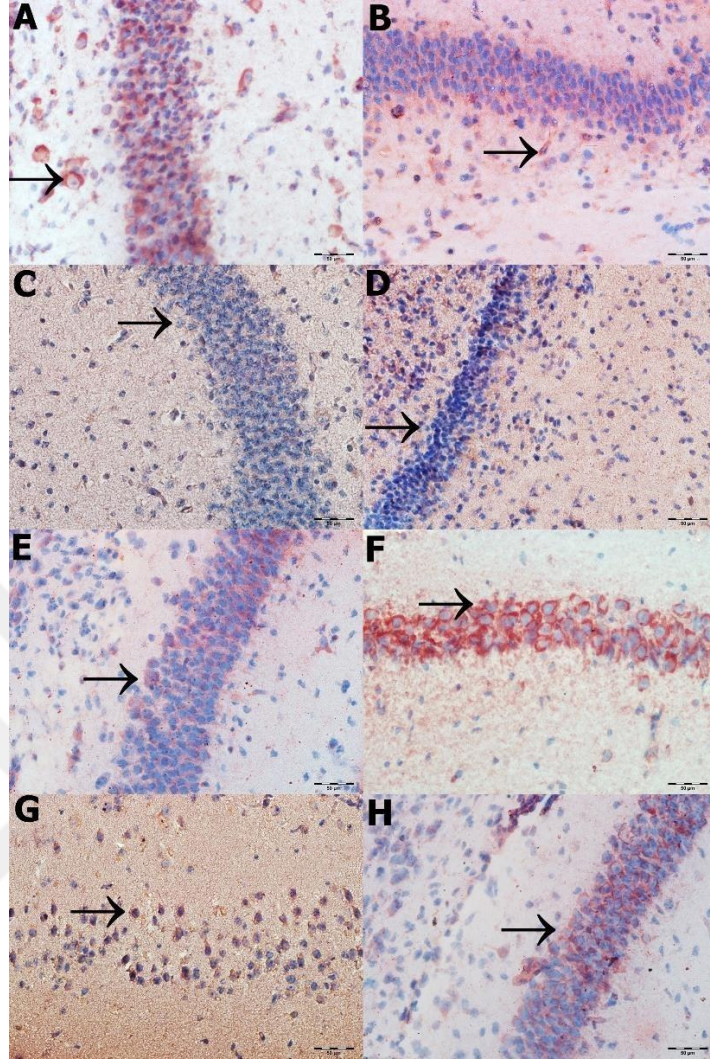


Şekil 18. Hipokampuste Bax immunreaktivitesi. A) 7. günde Grup K'nin nöronlarında (ok) zayıf pozitif immunreaktivite izlenmektedir. B) 7. günde Grup D'nin nöronlarında (ok) zayıf Bax immunreaktivitesi görülmektedir. C) 7. günde Grup S'nin nöronlarında (ok) güçlü pozitif Bax immunreaktivitesinin varlığı izlenmiştir. D) Grup SD'nin nöronlarında (ok) zayıf pozitif Bax immunreaktivitesi görülmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D'nin nöronlarında (ok) zayıf pozitif immunreaktivite izlenmiştir. G) 45. günde Grup S'nin nöronlarında (ok) pozitif immunreaktivite görülmektedir. H) 45. günde Grup SD'de minimal düzeyde Bax immunreaktivitesi izlenmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.1.2. Bcl-2 İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan hipokampus doku kesitleri Bcl-2 immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Değerlendirmede Grup K ve Grup D’de 7. günde güçlü pozitif Bcl-2 ekspresyonu izlendi (Şekil 19A-19B). Grup S’den alınan hipokampus doku kesitlerinde Bcl-2 immunreaktivitesinin zayıf düzeyde olduğu tespit edildi. Aynı zamanda bu gruptaki Bcl-2 ekspresyon düzeyinin Grup K ve Grup D’ye göre belirgin düzeyde düşük olduğu dikkati çekti (Şekil 19C). Grup SD’den 7. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde Bcl-2 immunreaktivitesinin Grup K’ye göre belirgin düzeyde düştüğü tespit edildi (Şekil 19D).

Çalışmada deneklerden 45. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde Bcl-2 immunreaktivitesinin 7. gündeki ekspresyon düzeyine benzerlik gösterdiği belirlendi. Grup K’de pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi belirgindi. Bununla birlikte Grup D’de Bcl-2 immunreaktivitesinin daha güçlü pozitif olduğu dikkati çekti. Grup S’de 45. günde immunreaktivitenin Grup K’ye göre azaldığı tespit edildi. Grup SD’den alınan hipokampus dokularında ise Bcl-2 immunreaktivitesinin Grup S’ye göre artmış olduğu belirlendi (19E-19H).



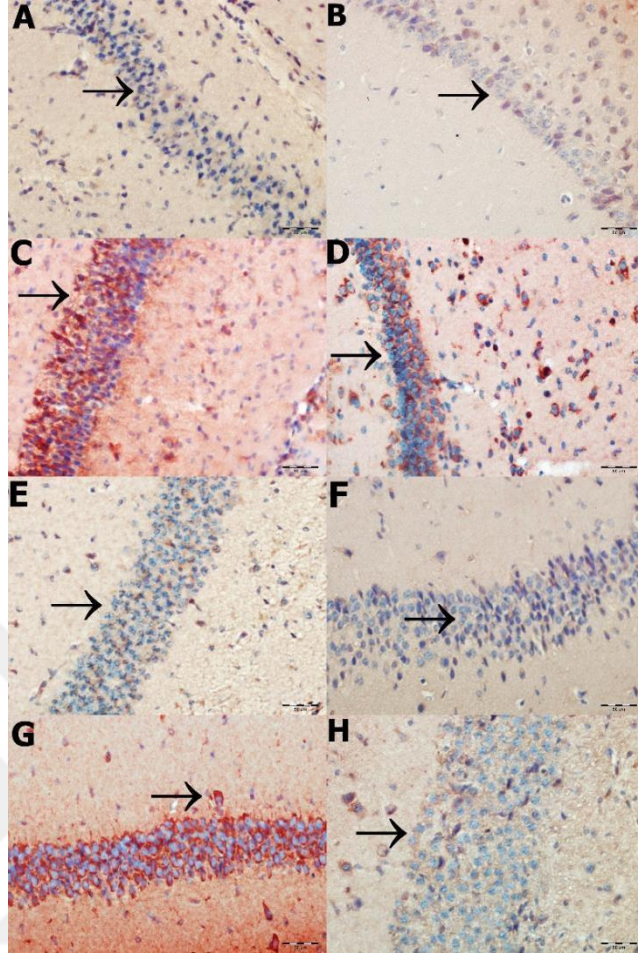
**Şekil 19. Hipokampuste Bcl-2 immunreaktivitesi. A) 7. günde Grup K'nin nöronlarında (ok) pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi izlenmektedir. B) 7. günde Grup D'nin nöronlarda (ok) Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. C) 7. günde Grup S nöronlarında (ok) minimal düzeyde Bcl-2 immunreaktivitesi izlenmektedir. D) Grup SD'nin nöronlarında (ok) zayıf pozitif düzeyde Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. E) 45. günde Grup K'nin nöronlarında (ok) Bcl-2 ekspresyonunun varlığı izlenmektedir. F) Grup D'nin nöronlarında (ok) çok güçlü pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. G) 45. günde Grup S'nin nöronlarında (ok) pozitif immunreaktivite minimal düzeyde izlenmiştir. H) 45. günde Grup SD'nin nöronlarda (ok) zayıf pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50  $\mu$ m.**

#### 4.2.1.3. IL-6 İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan hipokampus doku kesitleri IL-6 immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K ve D'nin nöronlarında ve perinöronal alanlarında pozitif IL-6 immunreaktivitesi görülmedi (Şekil 20A-20B). Diğer

taftan Grup S deneklerinden 7. günde alınan kesitlerde güçlü pozitif IL-6 immunreaktivitesinin varlığı dikkati çekti (Şekil 20C). Grup SD'den 7. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde pozitif IL-6 immunreaktivitesi tespit edildi. Aynı zamanda bu gruptaki pozitif immunreaktivitenin Grup S'ye göre nispeten daha düşük olduğu dikkati çekti (Şekil 20D).

Deneklerden 45. günde alınan hipokampus doku kesitlerinde IL-6 immunreaktivitesi için yapılan değerlendirmede, Grup K ve D'de herhangi bir pozitif IL-6 immunreaktivitesi görülmedi. Bununla birlikte Grup S'deki hipokampus doku kesitlerinde 7. güne benzer şekilde pozitif IL-6 immunreaktivitesinin güçlü pozitif düzeyde devam ettiği dikkati çekti. Diğer taraftan, Grup SD'den alınan doku kesitlerinde nöronlarda izlenen IL-6 immunreaktivitesinin Grup S'ye göre belirgin düzeyde azaldığı tespit edildi (Şekil 20E-20H).



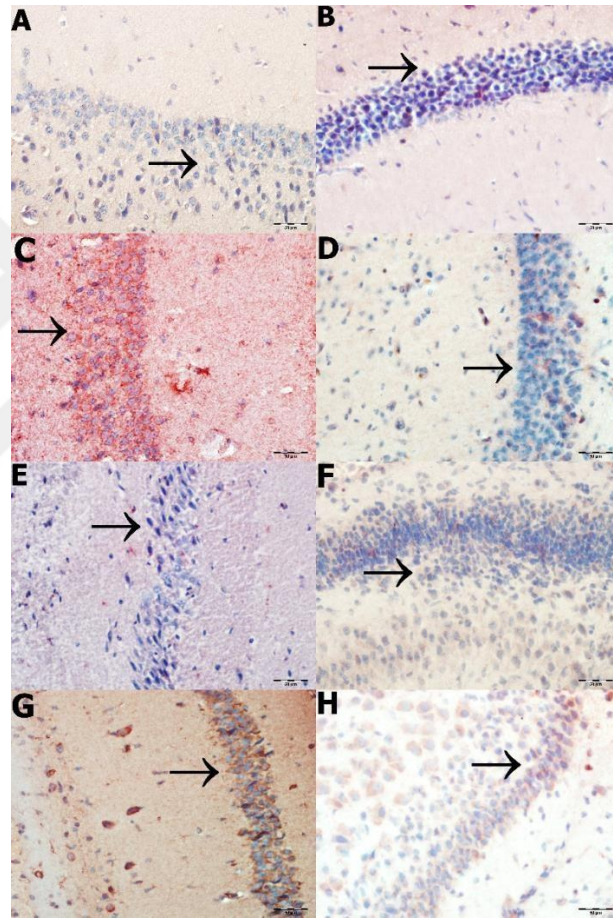
**Şekil 20.** Hipokampuste IL-6 immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve D'nin nöronlarında (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesi minimal düzeyde izlenmiştir. C) Grup S'nin nöronlarında (ok) güçlü pozitif IL-6 immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD'nin nöronlarında (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesi izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve D'nin nöronlarında (ok) IL-6 ekspresyonu minimal düzeyde izlenmiştir. G) 45. günde Grup S'nin nöronlarında (ok) güçlü pozitif IL-6 immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. H) 45. günde Grup SD'nin nöronlarında (ok) zayıf pozitif IL-6 immunreaktivitesi izlenmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.1.4. TNF- $\alpha$ İmmunohistokimyası

Grup K'den 7. günde alınan hipokampus dokuları TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde nöronlarda ekspresyonun olmadığı tespit edildi. Benzer şekilde Grup D'nin nöronlarında pozitif immunreaktivitenin olmadığı izlendi (Şekil 21A-21B). Diğer taraftan Grup S'de bakılan hipokampusteki nöronlarda ve gliya hücrelerinde TNF- $\alpha$  ekspresyonunun Grup K ve D'ye göre belirgin düzeyde arttığı dikkati çekti (Şekil 21C). Grup SD'den 7. günde alınan hipokampus dokusunda nöronlarda pozitif TNF- $\alpha$

immunreaktivitesi tespit edildi. Bununla birlikte bu gruptaki pozitif immunreaktivitenin Grup S'ye göre belirgin düzeyde düşük olduğu dikkati çekti (Şekil 21D).

Grup K ve D'nin 45. günde alınan hipokampus dokularındaki nöronlarda 7. güne benzer şekilde TNF- $\alpha$  ekspresyonunun olmadığı tespit edildi. Diğer taraftan Grup S'den alınan dokularda nöronlarda pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi belirlendi. Bununla birlikte Grup SD'den alınan hipokampusteki nöronlarda TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinin Grup S'ye göre nispeten azaldığı belirlendi (Şekil 21E-21H).

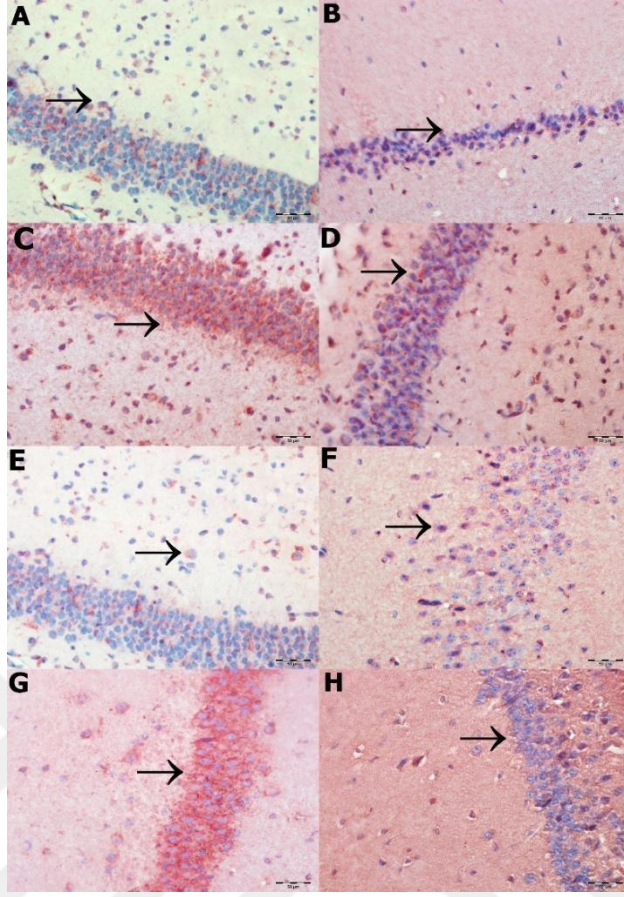


**Şekil 21.** Hipokampusta TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve D'nin nöronlarında (ok) pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinin minimal düzeyde varlığı görülmektedir. C) 7. günde Grup S'nin nöronlarında (ok) güçlü pozitif TNF- $\alpha$  ekspresyonu izlenmektedir. D) Grup SD'nin nöronlarında (ok) zayıf pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi görülmektedir. EF) 45. günde Grup K ve D'nin nöronlarında (ok) TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi zayıf düzeyde izlenmektedir. G) 45. günde Grup S'nin nöronlarında (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesinin varlığı görüldü. H) 45. günde Grup SD'nin nöronlarında (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesinin varlığı izlenmiştir. Bar: 50  $\mu$ m.

#### 4.2.1.5. c-Fos İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan hipokampus dokusu c-Fos immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Grup K ve D'nin nöronlarında c-Fos ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 22A-22B). Diğer taraftan Grup S'deki deneklerden alınan hipokampus dokusunda, nöronlarda güçlü pozitif c-Fos immunreaktivitesi dikkati çekti. Aynı zamanda Grup S'deki c-Fos ekspresyonunun Grup K ve Grup D'ye göre belirgin şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 22C). Grup SD'deki deneklerden alınan hipokampus dokusundaki nöronlarda da pozitif c-Fos immunreaktivitesi izlendi. Bununla birlikte bu gruptaki c-Fos ekspresyonunun Grup S'ye göre belirgin düzeyde düşük olduğu belirlendi (Şekil 22D).

Deneklerden 45. günde alınan hipokampus dokusunda nöronlarda c-Fos immunreaktivitesinin 7. güne benzer şekilde Grup K ve Grup D'de minimal düzeyde olduğu tespit edildi. Diğer taraftan Grup S'de c-Fos immunreaktivitesinin 7. güne benzer şekilde yüksek düzeyde olduğu dikkati çekti. Grup SD'de, c-Fos ekspresyon düzeyinin Grup S'ye göre azaldığı, bu durumun da 7. gündeki ekspresyona benzerlik gösterdiği belirlendi (22E-22H).

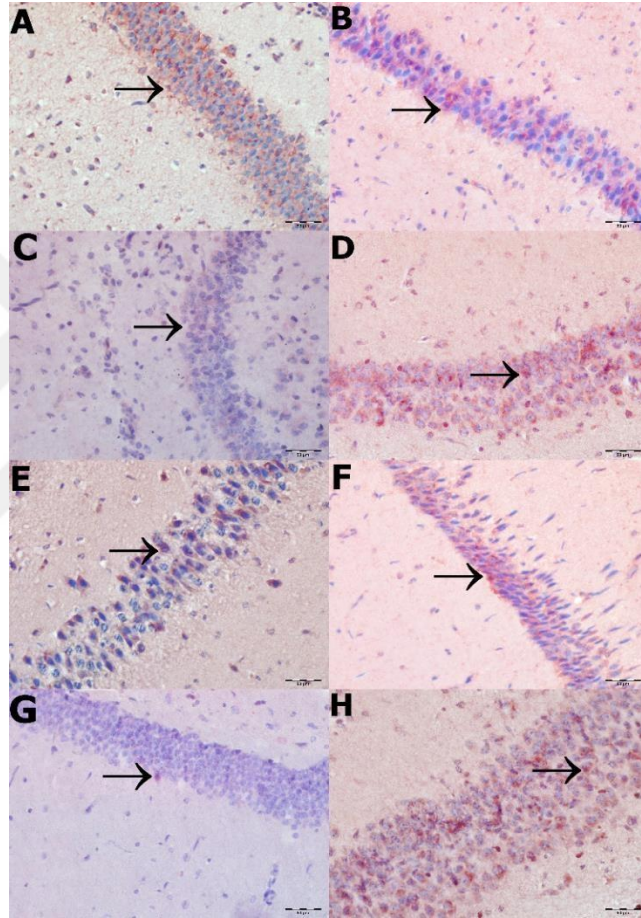


**Şekil 22.** Hipokampuste c-Fos immunreaktivitesi. A-B) 7. Günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) zayıf pozitif c-Fos immunreaktivitesi izlenmektedir. C) 7. günde Grup S’de nöronlarda (ok) çok güçlü pozitif c-Fos immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif c-Fos immunreaktivitesi izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) c-Fos immunreaktivitesi görülmektedir. G) Grup S’de 45. günde alınan hipokampusteki nöronlarda (ok) immunreaktivitenin güçlü pozitif olduğu varlığı belirgin izlenmiştir. H) Grup SD’den 45. günde alınan hipokampusa ait nöronlarda (ok) zayıf pozitif c-Fos immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.1.6. Olig2 İmmunohistokimyası

Grup K’den 7. günde alınan hipokampus dokularında nöronlarda pozitif Olig-2 immunreaktivitesi tespit edildi (Şekil 23A). Aynı şekilde Grup D’deki nöronlarda da Grup K’ye benzer şekilde pozitif Olig2 immunreaktivitesi izlendi (Şekil 23B). Bununla birlikte Grup S’deki deneklerden alınan hipokampus dokusundaki nöronlarda da, minimal düzeyde pozitif Olig2 immunreaktivitesi görüldü (Şekil 23C). Grup SD’den alınan hipokampus doku kesitlerinde ise nöronlarda Olig2 ekspresyonunun Grup S’ye göre arttığı, güçlü pozitif ekspresyon gösterdiği belirlendi (Şekil 23D).

Tüm gruplardan 45. günde alınan hipokampus doku kesitleri Olig2 immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede 45. günde Grup K ve Grup D'de 7. güne benzer şekilde pozitif Olig2 immunreaktivitesinin varlığı tespit edildi. Bununla birlikte Grup S'de, nöronlarda Olig2 immunreaktivitesi minimal düzeydeydi. Diğer taraftan Grup SD'deki hipokampus dokularında ise nöronlarda güçlü pozitif Olig2 ekspresyonu dikkati çekti (23E-23H).

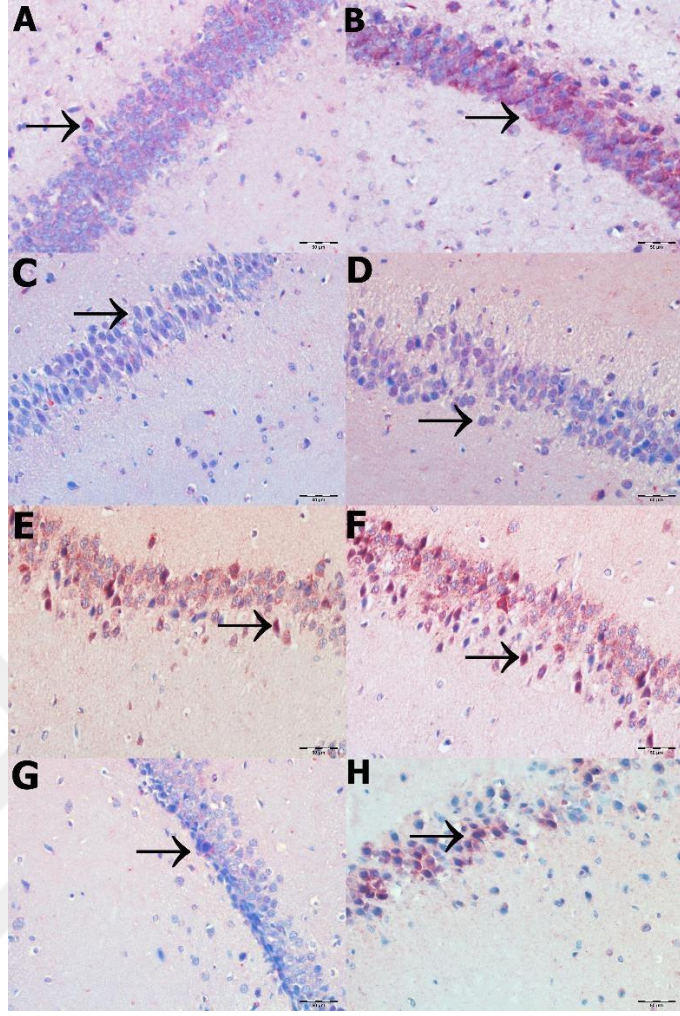


**Şekil 23.** Hipokampuste Olig2 immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D'de nöronlarda (ok) pozitif Olig2 ekspresyonu görülmektedir. C) 7. günde Grup S'de nöronlarda (ok) minimal düzeyde Olig2 immunreaktivitesinin varlığı izlenmektedir. D) Grup SD'de nöronlarda (ok) pozitif Olig2 immunreaktivitesinin Grup S'ye göre arttığı görülmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D'de nöronlarda (ok) pozitif Olig2 ekspresyonu izlenmektedir. G) Grup S'den 45. günde alınan hipokampusteki nöronlarda (ok) Olig2 immunreaktivitesinin minimal düzeyde varlığı görülmektedir. H) Grup SD'den 45. günde alınan hipokampuse ait nöronlarda (ok) güçlü pozitif Olig2 immunreaktivitesi izlenmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.1.7. BDNF İmmunohistokimyası

BDNF immunreaktivitesinin değerlendirilmesi için Grup K'den 7. günde alınan hipokampus dokularında nöronlarda pozitif BDNF immunreaktivitesi izlendi. Grup D'de ise nöronlarda BDNF immunreaktivitesinin Grup K'ye göre nispeten arttığı tespit edildi (Şekil 24A-24B). Grup S'de 7. günde BDNF immunreaktivitesinin minimal düzeyde varlığı dikkati çekti (Şekil 24C). Diğer taraftan Grup SD'de nöronlarda pozitif BDNF ekspresyonu belirlendi (Şekil 24D).

Gruplardan 45. günde alınan hipokampus dokuları BDNF immunreaktivitesi için değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K ve Grup D'de güçlü pozitif BDNF immunreaktivitesi izlendi. Diğer taraftan Grup S'de 45. günde nöronlarda BDNF ekspresyonunun çok düşük düzeyde olduğu dikkati çekti. Bununla birlikte Grup SD'de 45. günde nöronlarda BDNF ekspresyonunun Grup S'ye oranla belirgin şekilde arttığı belirlendi (24E-24H).



**Şekil 24.** Hipokampuste BDNF immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) pozitif BDNF immunreaktivitesi izlenmektedir. C) Grup S’de 7. günde nöronlarda (ok) minimal düzeyde BDNF immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif BDNF ekspresyonu izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) güçlü pozitif BDNF immunreaktivitesi görülmektedir. G) Grup S’den 45. günde alınan hipokampusteki nöronlarda (ok) BDNF immunreaktivitesinin minimal düzeyde varlığı izlenmektedir. H) Grup SD’den 45. günde alınan hipokampuse ait nöronlarda (ok) pozitif BDNF immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

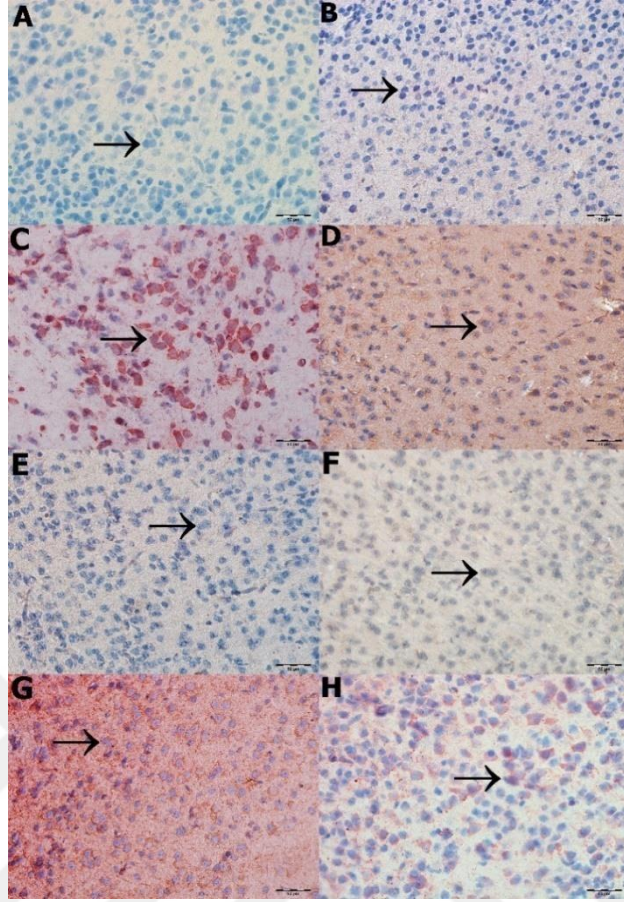
#### 4.2.2. Prefrontal Korteks

##### 4.2.2.1. Bax İmmunohistokimyası

Grup K deneklerinden 7. günde elde edilen prefrontal korteks dokusunda, Bax immunreaktivitesi değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede prefrontal kortekste

nöronlarda Bax immunreaktivitesi izlenmedi. Diğer taraftan Grup D’de de pozitif immunreaktivite tespit edilmedi (Şekil 25A-25B). Grup S’den 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunda nöronlarda ve gliya hücrelerinde Bax immunreaktivitesinin güçlü pozitif olduğu dikkati çekti (Şekil 25C). Bununla birlikte bGrup SD’den 7. günde alınan prefrontal korteks kesitlerinde nöronlarda Bax ekspresyonunda belirgin düşüşün olduğu izlendi (Şekil 2D).

Tüm gruplardan 45. günde alınan prefrontal korteks doku kesitleri Bax immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K ve Grup D’de herhangi bir pozitif Bax immunreaktivitesinin olmadığı tespit edildi. Diğer taraftan Grup S’de nöronlarda pozitif immunreaktivitenin 7. güne göre zayıfladığı izlenmekle birlikte ekspresyonun, 45. günde de devam ettiği dikkati çekti. Grup SD’de nöronlarda ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edildi (Şekil 25E-25H).

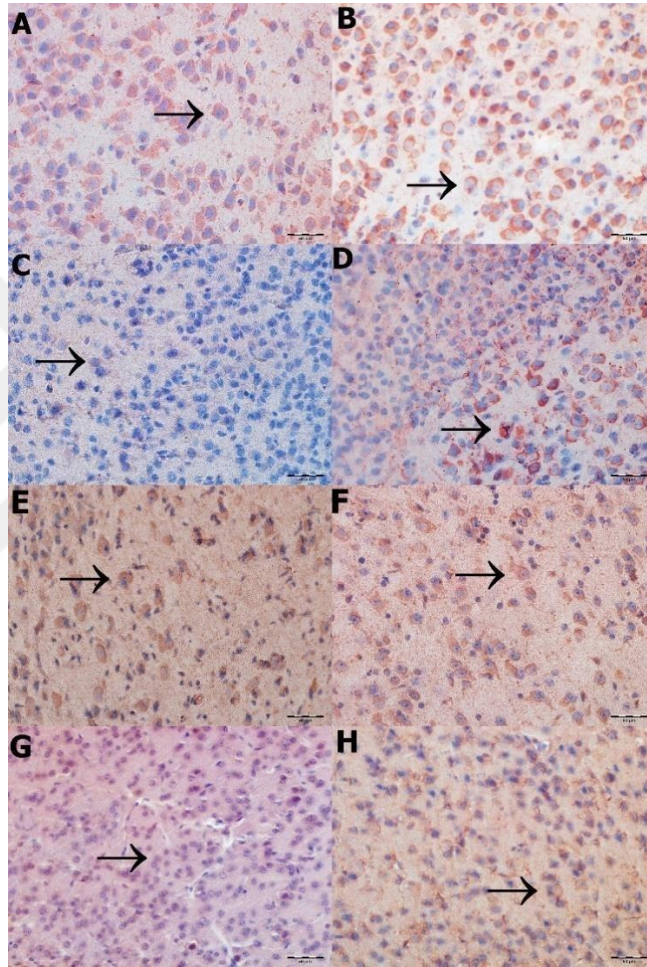


**Şekil 25. Prefrontal Kortekste Bax immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K’de nöronlarda (ok) pozitif immunreaktivite çok zayıf düzeyde izlenmektedir. C) 7. günde Grup S’den alınan prefrontal kortekste nöronlarda (ok) güçlü pozitif Bax immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) zayıf pozitif Bax immunreaktivitesi izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) minimal pozitif immunreaktivite görülmektedir. G) Grup S’den 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunda nöronlarda (ok) güçlü pozitif Bax immunreaktivitesi izlenmektedir. H) 45. günde Grup SD’de zayıf pozitif Bax immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.**

#### 4.2.2.2. Bcl-2 İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan prefrontal korteks dokuları, Bcl-2 immunreaktivitesi açısından incelendi. Yapılan incelemede Grup K ve Grup D’de nöronlarda güçlü pozitif Bcl-2 immunreaktivitesinin varlığı belirlendi (Şekil 26A-26B). Diğer taraftan Grup S’de 7. günde nöronlarda Bcl-2 ekspresyonunda Grup K’ye göre belirgin azalmanın olduğu dikkati çekti (Şekil 26C). Bununla birlikte Grup SD’de Bcl-2 ekspresyonunun nöronlarda Grup S’ye göre arttığı belirlendi. Aynı zamanda Grup SD’de ekspresyon düzeyinin Grup K’ye benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 26D).

Deneklerden 45. günde alınan prefrontal korteks dokusu Bcl-2 immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede 7. güne benzer şekilde Grup K ve Grup D’de belirgin Bcl-2 ekspresyonunun varlığı izlendi. Grup S’de nöronlarda Bcl-2 immunreaktivitesinin düştüğü, bu durumun 7. güne benzerlik gösterdiği dikkati çekti. Diğer taraftan Grup SD’de Bcl-2 immunreaktivitesinin arttığı, Grup K’ye benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 26E-26H).

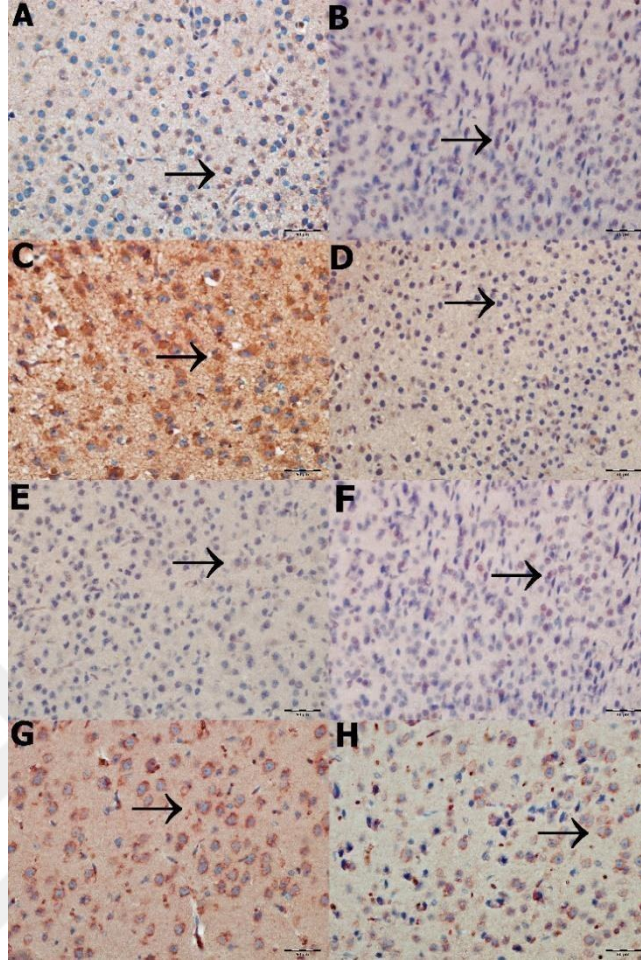


**Şekil 26.** Prefrontal kortekste Bcl-2 immunreaktivitesi. A) 7. günde Grup K’de nöronlarda (ok) pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi izlenmiştir. B) 7. günde Grup D’de nöronlarda (ok) Bcl-2 ekspresyonunun varlığı görülmektedir. C) 7. günde Grup S’de nöronlarda (ok) minimal düzeyde Bcl-2 immunreaktivitesi izlenmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. E) 45. günde Grup K’de nöronlarda (ok) Bcl-2 ekspresyonunun varlığı izlenmektedir. F) 45. gün Grup D’de nöronlarda (ok) güçlü pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. G) 45. günde Grup S’de nöronlarda (ok) pozitif immunreaktivitenin zayıf pozitif olduğu izlenmektedir. H) 45. günde Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif Bcl-2 immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.2.3. IL-6 İmmunohistokimyası

Deneklerden elde edilen prefrontal korteks dokuları IL-6 immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K ve Grup D’de nöronlarda minimal düzeyde ekspresyon varlığı izlendi (Şekil 27A-27B). Diğer taraftan IL-6 ekspresyonunun Grup S’de, Grup K ve Grup D’ye göre nöronlarda arttığı dikkati çekti (Şekil 27C). Grup SD’deki deneklerde nöronlarda IL-6 ekspresyonunda Grup S’ye göre azalmanın olduğu izlendi (Şekil 27D).

Gruplardan 45. günde alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde Grup K ve Grup D’de nöronlarda IL-6 immunreaktivitesi minimal düzeyde görülürken, Grup S’de IL-6 pozitif immunreaktivitesinin nöronlarda varlığı tespit edildi. Bununla birlikte Grup SD’de IL-6 ekspresyon düzeyinin Grup S’ye göre nöronlarda nispeten azaldığı belirlendi (Şekil 27E-27H).

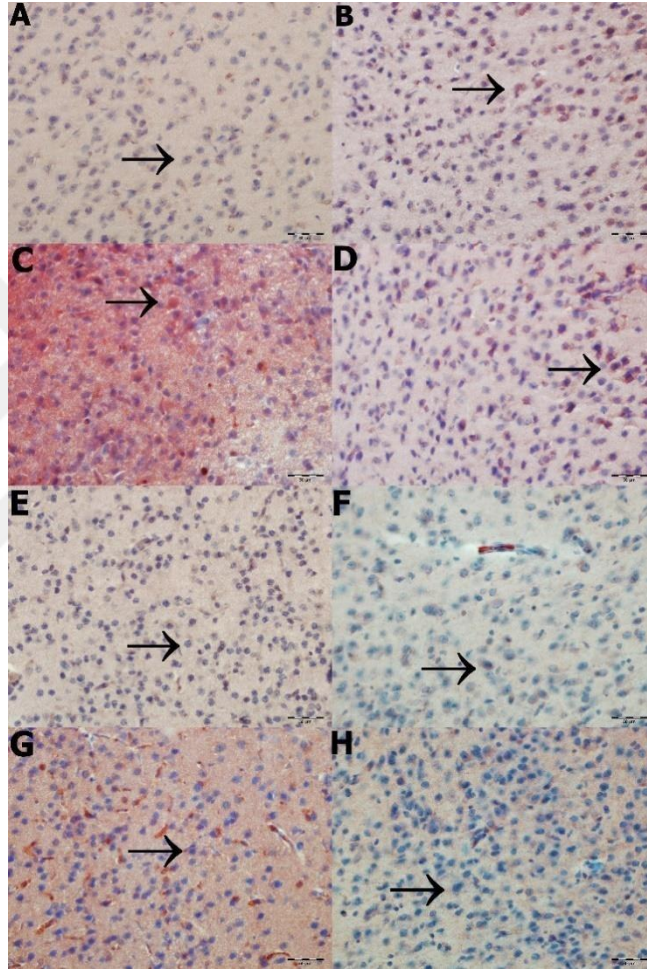


**Şekil 27.** Prefrontal kortekste IL-6 immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesi minimal düzeyde izlenmektedir. C) 7. günde Grup S’de nöronlarda (ok) güçlü pozitif IL-6 immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesi izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) IL-6 ekspresyonu düşük düzeyde görülmektedir. G) 45. günde Grup S’de nöronlarda (ok) güçlü pozitif IL6 immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. H) 45. günde Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif IL-6 immunreaktivitesi izlenmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.2.4. TNF- $\alpha$ İmmunohistokimyası

Grup K’den 7. günde alınan prefrontal korteks dokularında nöronlarda TNF- $\alpha$  ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu tespit edildi. Aynı zamanda Grup D’de prefrontal kortekste nöronlarda minimal ekspresyon izlendi (Şekil 28A-28B). Grup S’den alınan prefrontal korteks nöronlarında TNF- $\alpha$  pozitif immunreaktivitesinin varlığı tespit edildi. Diğer taraftan Grup SD’de 7. günde nöronlarda ekspresyon düzeyinde Grup S’ye göre belirgin azalmanın olduğu belirlendi (Şekil 28C-28D).

Grup K ve Grup D'den 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunda nöronlarda 7. güne benzer şekilde TNF- $\alpha$  ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu tespit edildi. Diğer taraftan Grup S'den alınan dokularda nöronlarda pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinin Grup K'ye göre arttığı belirlendi. Bununla birlikte Grup SD'den alınan prefrontal korteks dokularında, nöronlarda TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinin Grup S'ye göre azaldığı izlendi (Şekil 28E-28H).

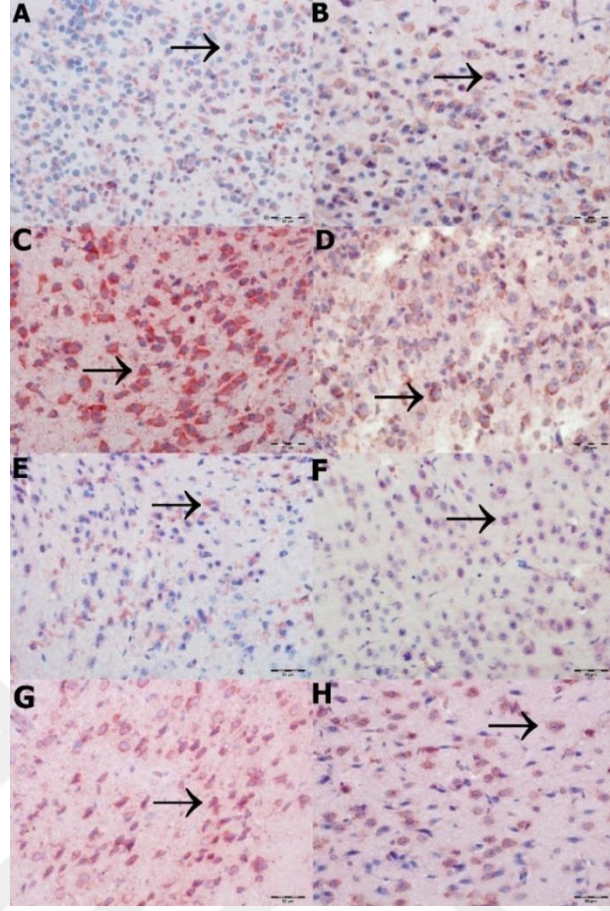


Şekil 28. Prefrontal kortekste TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D'de nöronlarda (ok) pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi zayıf pozitif düzeyde görülmektedir. C) 7. günde Grup S'de nöronlarda (ok) güçlü pozitif TNF- $\alpha$  ekspresyonu izlenmektedir. D) Grup SD'de nöronlarda (ok) zayıf pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi görülmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D'de nöronlarda (ok) herhangi bir TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi minimal düzeyde izlenmektedir. G) 45. günde Grup S'de nöronlarda (ok) pozitif TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. H) 45. günde Grup SD'de nöronlarda (ok) minimal düzeyde TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinin varlığı izlenmektedir. Bar: 50  $\mu$ m.

#### 4.2.2.5. c-Fos İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan prefrontal korteks dokuları c-Fos immunreaktivitesi açısından tüm gruplarda değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K ve Grup D'de nöronlarda, c-Fos ekspresyonunun varlığı belirlendi (Şekil 29A-29B). Diğer taraftan Grup S'de nöronlarda izlenen c-Fos ekspresyonunda Grup K'ye göre belirgin artışın varlığı dikkati çekti (Şekil 29C). Grup SD'den alınan prefrontal korteks dokularında nöronlarda c-Fos ekspresyonunun nispeten azaldığı, Grup K'ye benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 29D).

Deneklerden 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunda nöronlarda c-Fos immunreaktivitesinin 7. güne benzer şekilde Grup K ve Grup D'de düşük düzeyde olduğu belirlendi. Diğer taraftan Grup S'de c-Fos immunreaktivitesinin nöronlarda 7. güne benzer şekilde yüksek düzeyde ekspresyonu tespit edildi. Grup SD'de, c-Fos ekspresyon düzeyinin Grup S'ye benzerlik gösterdiği tespit edildi (29E-29H).



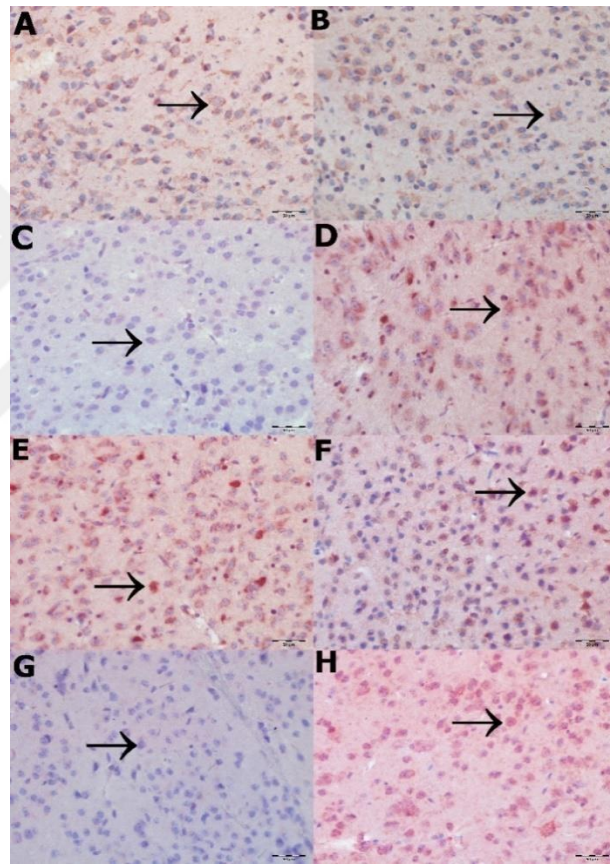
**Şekil 29.** Prefrontal kortekste c-Fos immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) pozitif c-Fos immunreaktivitesi zayıf düzeyde izlenmektedir. C) 7. günde Grup S’de nöronlarda (ok) çok güçlü pozitif c-Fos immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif c-Fos immunreaktivitesi izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) c-Fos immunreaktivitesi görülmektedir. G) Grup S’den 45. günde alınan prefrontal kortekste nöronlarda (ok) c-Fos ekspresyonunun varlığı izlenmektedir. H) Grup SD’den 45. günde alınan hipokampusa ait nöronlarda (ok) pozitif c-Fos immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.2.6. Olig2 İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan prefrontal korteks dokuları Olig2 immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede Grup K’de 7. günde nöronlarda pozitif Olig2 immunreaktivitesinin varlığı izlendi (Şekil 30A). Aynı zamanda Grup D’de de nöronlarda pozitif Olig2 ekspresyonunun varlığı belirlendi (Şekil 30B). Diğer taraftan Grup S’den alınan prefrontal korteks dokularındaki nöronlarda zayıf pozitif Olig2 immunreaktivitesinin varlığı tespit edildi (Şekil 30C).

Grup SD’de nöronlarda Olig2 ekspresyonunun güçlü pozitif varlığı dikkati çekti (Şekil 30D).

Tüm gruplardan 45. günde alınan prefrontal korteks dokuları Olig2 immunreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde, Grup K ve Grup D’de 7. güne benzer şekilde nöronlarda pozitif Olig2 immunreaktivitesinin varlığı tespit edildi. Bununla birlikte Grup S’de nöronlarda Olig2 ekspresyon düzeyinin minimal olduğu dikkati çekti. Diğer taraftan Grup SD’de nöronlarda ekspresyonunun güçlü pozitif düzeyde olduğu izlendi (30E-30H).

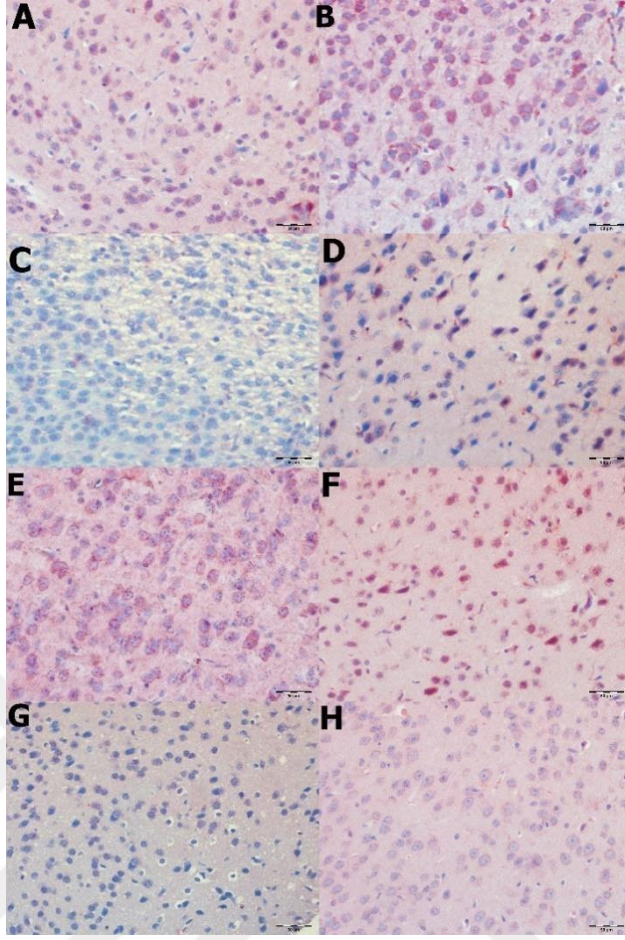


**Şekil 30.** Prefrontal kortekste Olig2 immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) pozitif Olig2 ekspresyonu izlenmektedir. C) 7. günde Grup S’de nöronlarda (ok) zayıf pozitif Olig2 immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) güçlü pozitif Olig2 immunreaktivitesinin varlığı izlenmektedir. EF) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) pozitif Olig2 ekspresyonu görülmektedir. G) Grup S’den 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunda, nöronlarda (ok) Olig2 immunreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. H) Grup SD’de 45. günde alınan prefrontal kortekse ait nöronlarda (ok) güçlü pozitif Olig2 immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.2.7. BDNF İmmunohistokimyası

Deneklerden 7. günde alınan prefrontal korteks dokularında BDNF immunreaktivitesi incelendi. Yapılan incelemede Grup K ve Grup D'den alınan dokularda nöronlarda güçlü pozitif düzeyde BDNF ekspresyonunun varlığı tespit edildi (Şekil 31A-31B). Diğer taraftan Grup S'de 7. günde nöronlarda BDNF ekspresyonunun, Grup K ve Grup D'ye göre belirgin şekilde azaldığı dikkati çekti (Şekil 31C). Bununla birlikte ) Grup SD'de, nöronlarda BDNF ekspresyon düzeyinin Grup S'ye göre arttığı belirlendi (Şekil 31D).

Gruplardan 45. günde alınan prefrontal korteks dokularında, BDNF immunreaktivitesi için yapılan değerlendirmede Grup K ve Grup D'de nöronlarda güçlü pozitif BDNF immunreaktivitesinin varlığı belirlendi. Diğer taraftan Grup S'de 45. günde, 7. güne benzer şekilde nöronlarda BDNF ekspresyonunun minimal düzeyde varlığı dikkati çekti. Bununla birlikte Grup SD'de 45. günde BDNF ekspresyonunun pozitif varlığı izlendi (31E-31H).



**Şekil 31.** Prefrontal kortekste BDNF immunreaktivitesi. A-B) 7. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) pozitif BDNF immunreaktivitesi izlenmektedir. C) Grup S’de 7. günde nöronlarda (ok) minimal BDNF immunreaktivitesinin varlığı görülmektedir. D) Grup SD’de nöronlarda (ok) pozitif BDNF ekspresyonu izlenmektedir. E-F) 45. günde Grup K ve Grup D’de nöronlarda (ok) güçlü pozitif BDNF immunreaktivitesi görülmektedir. G) Grup S’de 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunda, nöronlarda (ok) BDNF immunreaktivitesinin zayıf pozitif varlığı izlenmektedir. H) Grup SD’den 45. günde alınan prefrontal kortekste izlenen nöronlarda (ok) pozitif BDNF immunreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

#### 4.2.3. İmmunohistokimyasal Skorlama

H skor analizi ile immunohistokimyasal analizler semikantitatif olarak değerlendirildi.

**Tablo 4. 7.Günde Hipokampus Dokusunda İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi**

| Grup | Bax  | Bcl-2 | IL-6 | TNF- $\alpha$ | c-Fos | Olig-2 | BDNF |
|------|------|-------|------|---------------|-------|--------|------|
| K    | +    | +++   | +    | +             | ++    | ++     | ++   |
| D    | +    | +++   | +    | +             | ++    | ++     | ++   |
| S    | ++++ | +     | +++  | +++           | ++++  | +      | +    |
| SD   | ++   | +++   | +    | ++            | ++    | ++     | ++   |

**Tablo 5. 45.Günde Hipokampuste İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi**

| Grup | Bax | Bcl-2 | IL-6 | TNF- $\alpha$ | c-Fos | Olig-2 | BDNF |
|------|-----|-------|------|---------------|-------|--------|------|
| K    | +   | +++   | +    | +             | ++    | ++     | ++   |
| D    | +   | ++++  | +    | +             | ++    | +++    | ++   |
| S    | +++ | +     | +++  | +++           | ++++  | +      | +    |
| SD   | +   | ++++  | ++   | +             | ++    | ++     | ++   |

**Tablo 6. 7.Günde Prefrontal Kortekste İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi**

| Grup | Bax  | Bcl-2 | IL-6 | TNF- $\alpha$ | c-Fos | Olig-2 | BDNF |
|------|------|-------|------|---------------|-------|--------|------|
| K    | +    | +++   | +    | +             | +     | ++     | ++   |
| D    | +    | +++   | +    | +             | ++    | ++     | ++   |
| S    | ++++ | +     | ++++ | +++           | ++++  | +      | +    |
| SD   | ++   | +++   | ++   | ++            | ++    | ++     | ++   |

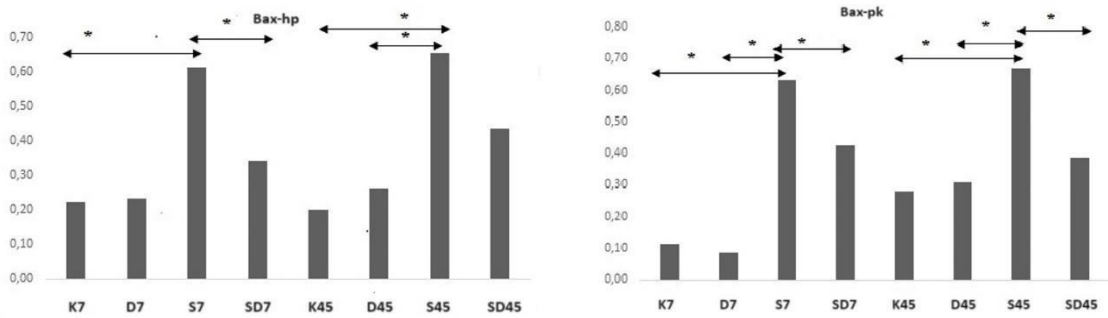
**Tablo 7. 45.Günde Prefrontal Kortekste İmmunohistokimyasal Bulguların Semikantitatif Değerlendirmesi**

| Grup | Bax | Bcl-2 | IL-6 | TNF- $\alpha$ | c-Fos | Olig-2 | BDNF |
|------|-----|-------|------|---------------|-------|--------|------|
| K    | +   | +++   | +    | +             | ++    | ++     | ++   |
| D    | +   | +++   | +    | +             | ++    | +++    | ++   |
| S    | +++ | +     | +++  | +++           | +++   | +      | +    |
| SD   | ++  | ++    | ++   | ++            | +++   | ++     | ++   |

#### 4.2.4. İmmunohistokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi

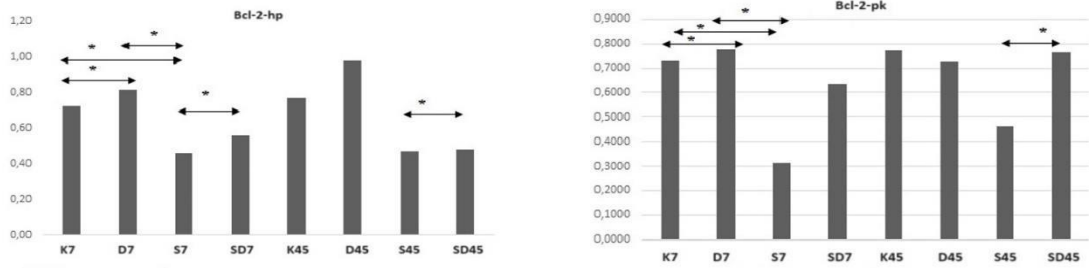
Hipokampus ve prefrontal kortekste, immunohistokimyasal bulguların istatistiksel analizi ile Bax, Bcl-2, IL-6, Tnf- $\alpha$ , c-Fos, Olig-2 ve BDNF ekspresyonları değerlendirildi.

Bax ekspresyonunun immunohistokimyasal skorlama yapılarak istatistiksel değerlendirmesi incelendi. Yapılan değerlendirme sonucunda hipokampus ve prefrontal kortekste 7. günde deney grubuna ait hipokampus ve prefrontal korteksteki nöronların perikaryonlarında Bax immunreaktivitesi açısından Grup S ile Grup K, D, SD arasında anlamlı farkın olduğu tespit edildi. Özellikle Grup S’de diğer gruplara göre anlamlı artışın olduğu dikkati çekti. Bununla birlikte Grup SD’de, Grup S’ye göre anlamlı azalmanın olduğu tespit edildi. Benzer şekilde 45. günde de Grup S’de diğer gruplara göre anlamlı artışın devam ettiği belirlendi.



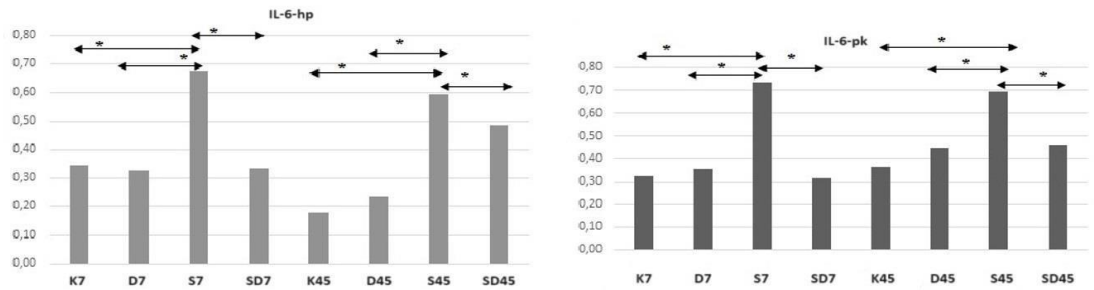
Şekil 32. Bax için immunohistokimyasal skorlama. \*p<0,0001

Bcl-2 immunohistokimyasının istatistiksel analizinde hipokampus ve prefrontal kortekste 7. günde; Grup K ve Grup D arasında istatistiksel farkın olduğu, Grup D’de anlamlı artışın olduğu tespit edildi. Diğer taraftan Grup S’de belirgin Bcl-2 azalmasının tüm gruplara göre anlamlı olduğu dikkati çekti. Özellikle Grup S ile Grup SD kıyaslandığında Grup SD’de, Grup S’ye göre anlamlı artışın olduğu çalışmamızda görüldü. 45. gündeki veriler için yapılan istatistiksel analizde Grup S ile Grup SD arasında istatistiksel fark azalmış olsa da farkın anlamlı olduğu dikkati çekti.



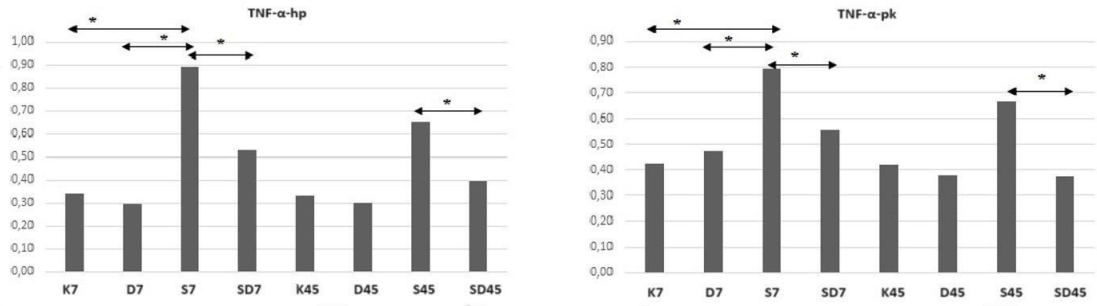
Şekil 33. Bcl-2 için immunohistokimyasal skorlama. \*p<0,0001

IL-6 ekspresyonu açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede 7. günde hem hipokampusta hem de prefrontal kortekste Grup S'deki ekspresyonda görülen artışın tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Aynı zamanda Grup S ile Grup SD arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu; Grup SD'de anlamlı azalmanın varlığı dikkat çekiciydi. 45. günde Grup K, D, SD ile Grup S arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Grup S'de IL-6 ekspresyonunun diğer gruplara göre anlamlı artışı dikkati çekti.



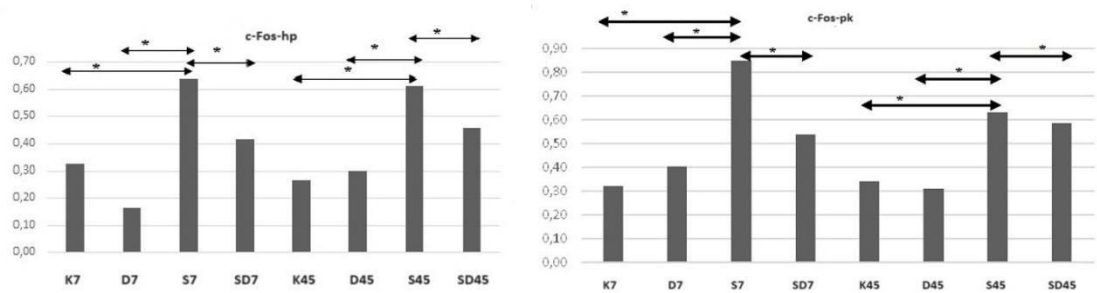
Şekil 34. IL-6 için immunohistokimyasal skorlama. \*p<0,0001

Tnf- $\alpha$  immunohistokimyasının istatistiksel değerlendirilmesinde hipokampus ve prefrontal kortekste 7. günde, tüm gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Özellikler Grup S'deki ekspresyon düzeyindeki artış, diğer tüm gruplara göre oldukça anlamlıydı. Diğer taraftan Grup S ile Grup SD kıyaslandığında Grup SD'deki azalmanın Grup S'ye göre azalmasının anlamlı olması, oldukça dikkat çekiciydi. 45. günde istatistiksel fark azalmış olmasına rağmen Grup SD'deki azalmanın Grup S'ye göre anlamlı olması, çalışmamız açısından oldukça dikkat çekiciydi.



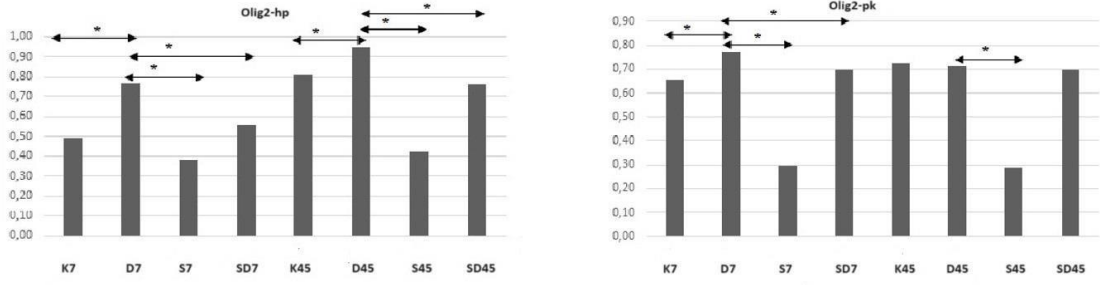
Şekil 35. TNF- $\alpha$  için immunohistokimyasal skora. \* $p < 0,0001$

c-Fos immunohistokimyasının istatistiksel değerlendirmesinde hipokampus ve prefrontal kortekste 7. günde; Grup K, D, SD ile Grup S arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Grup S’de ekspresyon düzeyindeki azalma, Grup SD’ye göre belirgin şekilde anlamlıydı. Diğer taraftan 45. günde de Grup SD’deki c-Fos ekspresyonundaki artış Grup S’ye göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



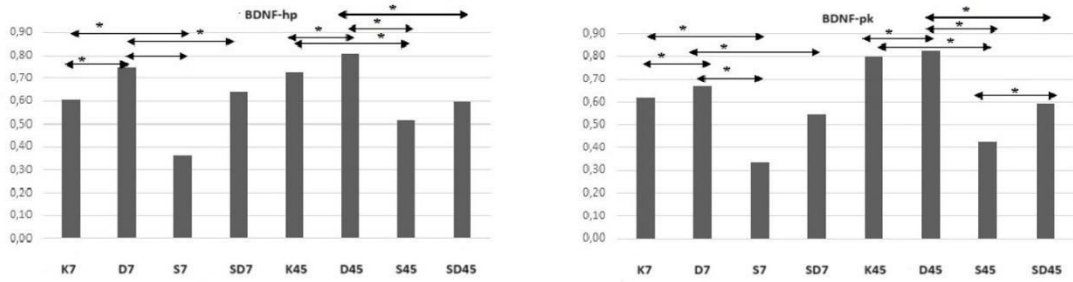
Şekil 36. c-Fos için immunohistokimyasal skora. \* $p < 0,0001$

Olig-2 için yapılan immunohistokimyasal analizlerin istatistiksel olarak yapılan değerlendirmesinde hipokampus ve prefrontal kortekste 7. günde, Grup D’de yüksek düzeyde ekspresyon, istatistiksel olarak fark diğer gruplara göre anlamlıydı. Aynı zamanda Grup S’deki azalma diğer tüm gruplara göre anlamlı bulundu. Özellikle Grup SD’deki ekspresyon düzeyindeki artışın, Grup S’ye göre anlamlı bulunması dikkat çekiciydi. 45. günde de 7.güne benzer şekilde Grup S’deki azalma diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 45. günde Grup S ve Grup SD arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunması dikkati çekti.



Şekil 37. Olig2 için immunohistokimyasal skarlama. \*p<0,0001

BDNF immunohistokimyasının istatistiksel değerdendirmesinde hipokampus ve prefrontal kortekte 7.günde, Grup D'deki ekspresyon düzeyinin yüksekliği, diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Aynı zamanda Grup D'deki yüksek düzeyde ekspresyonun Grup S'ye göre anlamlı olduğu belirlendi. Diğer taraftan Grup S'deki düşük ekspresyon düzeyinin, diğer tüm gruplara göre anlamlı bulunduğu tespit edildi. Grup SD'deki ekspresyonun Grup S'ye göre yüksek düzeyde olması istatistiksel olarak anlamlıydı. 45. günde yapılan istatistiksel değerdirmede Grup K ve Grup S'deki fark istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi. Grup D'deki yüksek düzeyde ekspresyonun diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu belirlendi. Özellikle Grup S'deki düşük ekspresyon ile Grup SD'deki ekspresyon farkının anlamlı çıkması çalışmamız için dikkat çekiciydi.



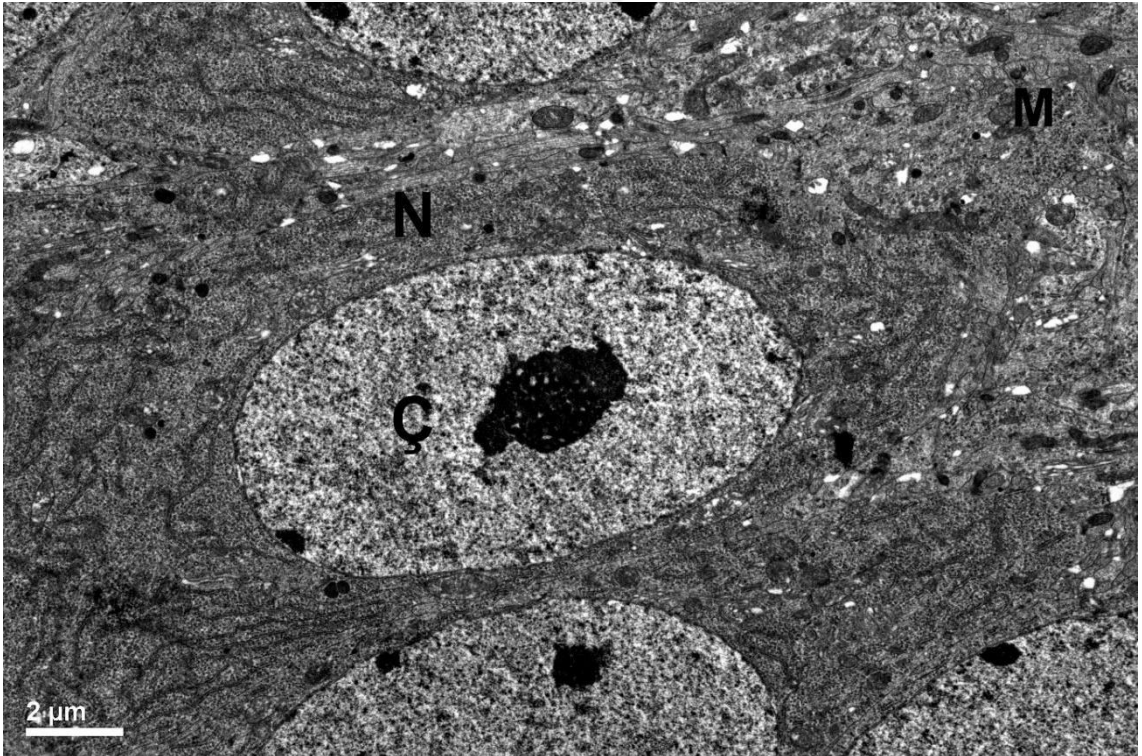
Şekil 38. BDNF için immunohistokimyasal skarlama. \*p<0,0001

### 4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

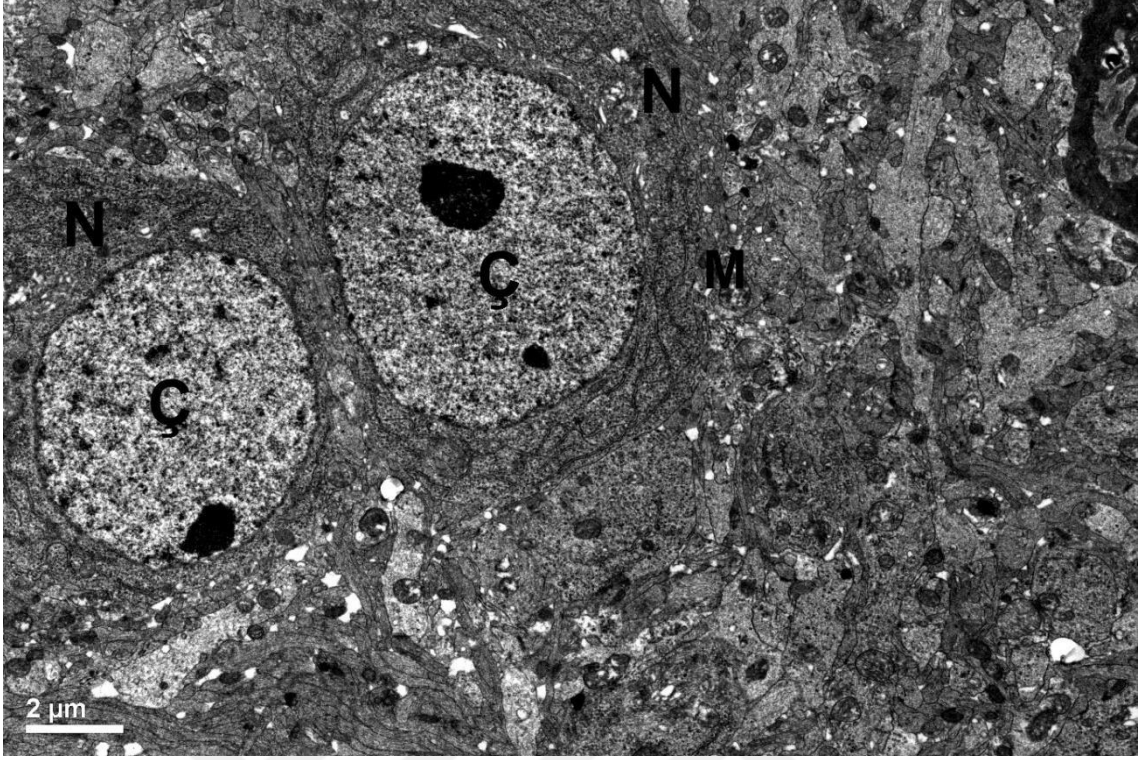
#### 4.3.1. Hipokampus

##### 4.3.1.1. Grup K

Grup K'den 7. ve 45. günde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlar ve gliya hücreleri ile miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin normal yapıda oldukları görüldü. Nöronların perikaryonları; merkezi yerleşimli oval bir çekirdek ve bunun etrafını çevreleyen perinükleer sitoplazmadı luşmaktaydı. Veziküler tipteki çekirdeğin içerisinde bir veya birden fazla çekirdekçik yer almaktaydı. Nöroplazmada mitokondriyonlar, Golgi kompleksi, granüler endoplazmik retikülüm sisternaları, serbest ribozomlar ve lizozomlar ayırt edildi. Gliyahücreleri de çekirdek ve sitoplazmik organelleri ile normal görünümde izlendi. Miyelin kılıfa sahip sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın normal yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 39-40).



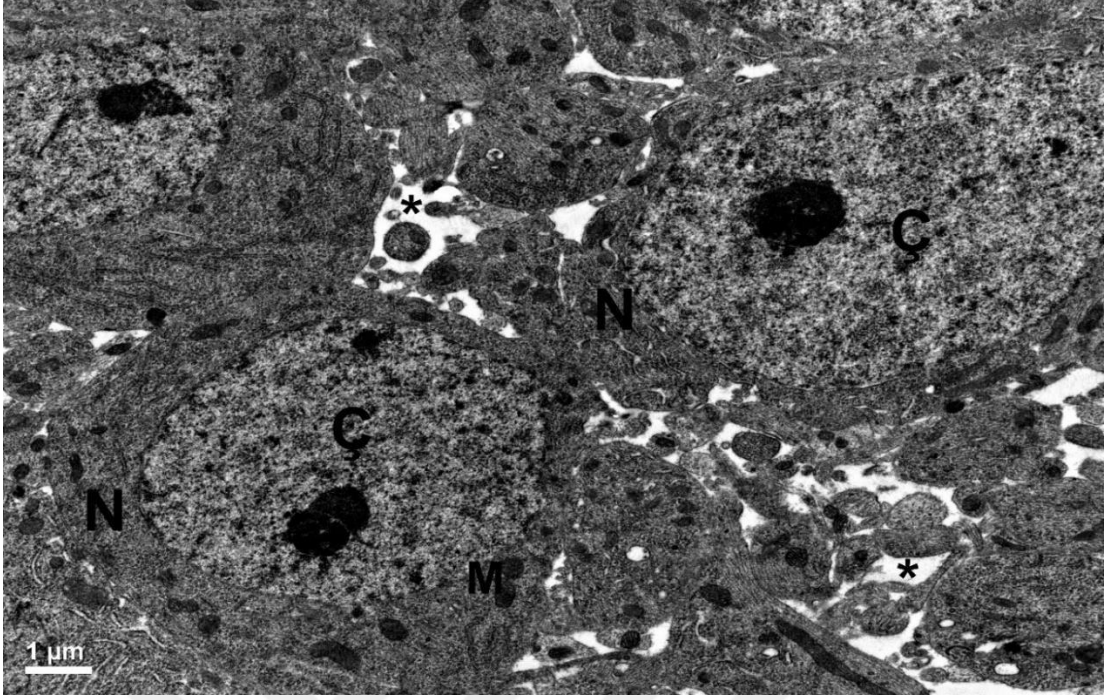
Şekil 39. Grup K'den 7. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronun (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerinin normal yapıda olduğu görülmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 2 µm.



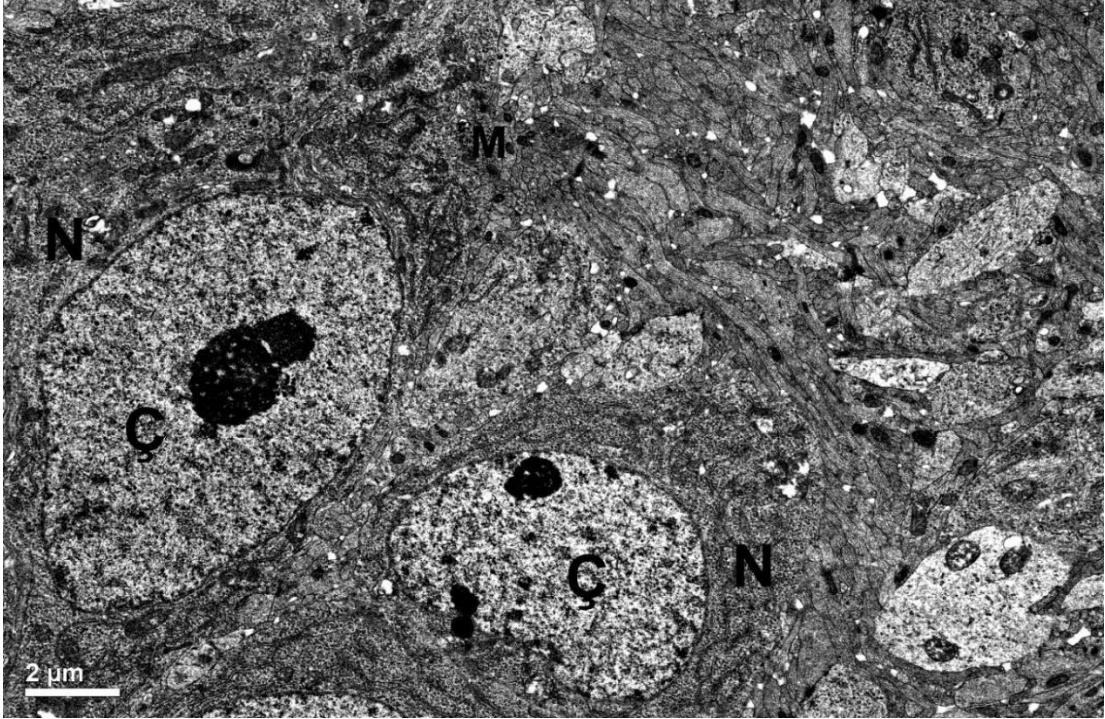
**Şekil 40.** Grup K'den 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) çekirdeğin (Ç) ve sitoplazmadaki mitokondriyonlar (M) normal yapıdaydı. Bar: 1 µm.

#### 4.3.1.2. Grup D

Grup D'nin 7. gününde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöron ve gliya hücrelerine ait çekirdek, sitoplazmik organeller, akson ve miyelin kılıf normal yapıdaydı. Ancak yer yer interselüler boşluklar görüldü (Şekil41). Grup D'nin 45. gününde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde genel olarak nöron ve gliyalara ait çekirdekler ve sitoplazmanın ultrastrüktürel yapısının normal olduğu görülmektedir (Şekil 42).



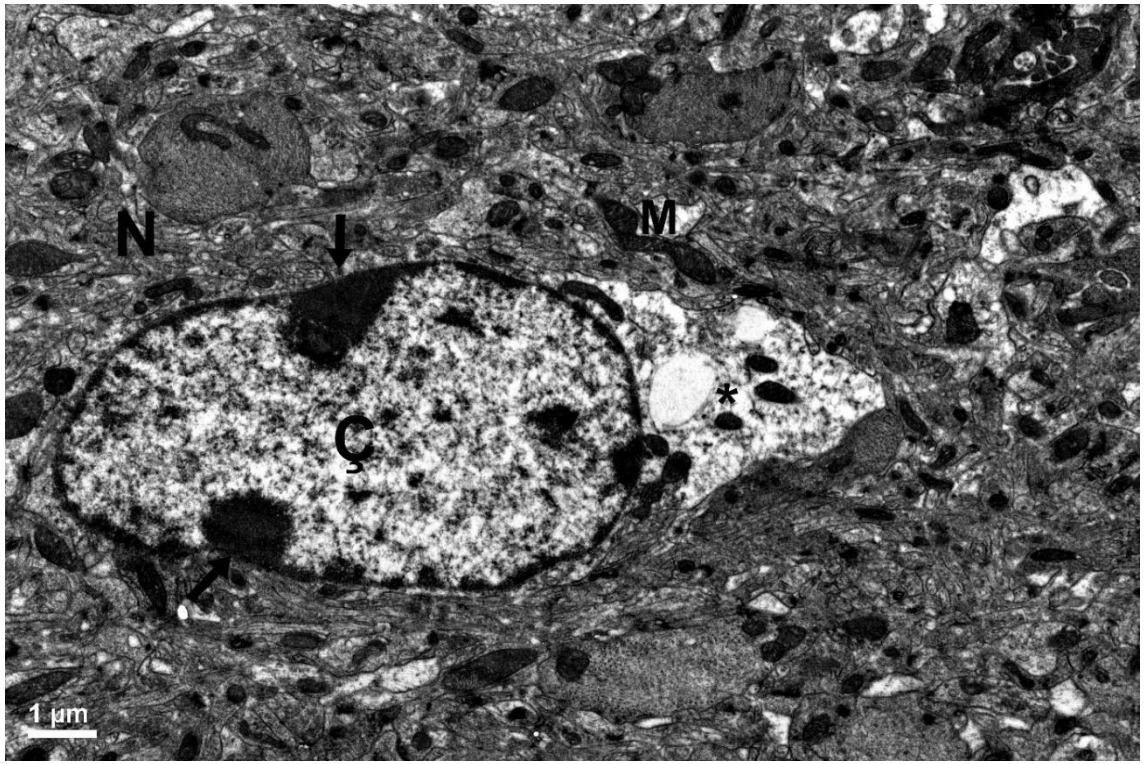
Şekil 41. Grup D'nin 7. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronlara (N) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapıda izlenmektedir. Yer yer intersellüler boşluklar (\*) görülmüştür. Mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.



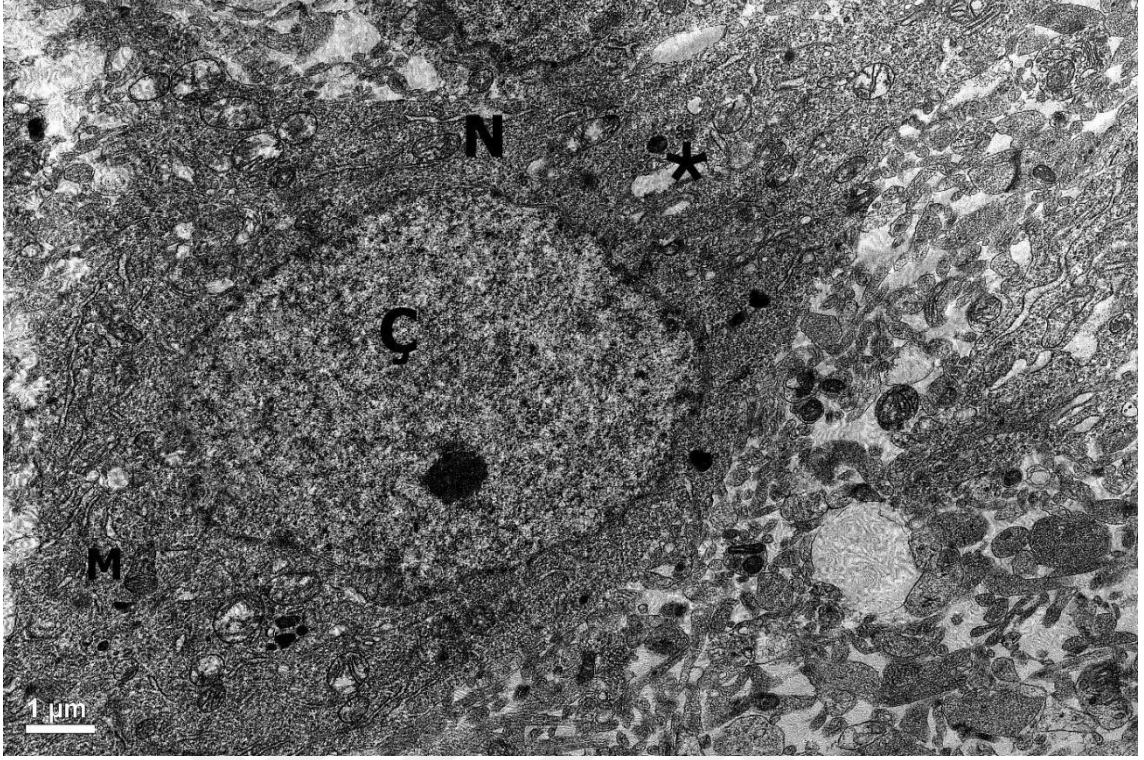
Şekil 42. Grup D'nin 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Normal yapıda nöronlara (N) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma izlenmiştir. Mitokondriyon (M). Bar: 2 µm.

#### 4.3.1.3. Grup S

Grup S'nin 7. gününde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlara ait çekirdeklerde periferik kromatin yoğunlaşması ve nöron sitoplazmalarında vakuolizasyon izlendi. (Şekil 43). Gliya hücreleri nispeten normal görünümdeydi. Grup S'nin 45. gününde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde genel olarak nöronlara ait çekirdekler ve sitoplazmanın normal yapısının korunduğu ancak intersellüler alanlarda vakuolizasyonun varlığı dikkati çekti (Şekil 44). Gliya hücreleri ise normal yapıdaydı.



Şekil 43. Grup S'nin 7. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) çekirdeklerinde (Ç) periferik kromatin yoğunlaşması (ok) ve sitoplazmalarında ödem (\*) ile organellerinde hafif yapısal değişiklikler izlenmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.

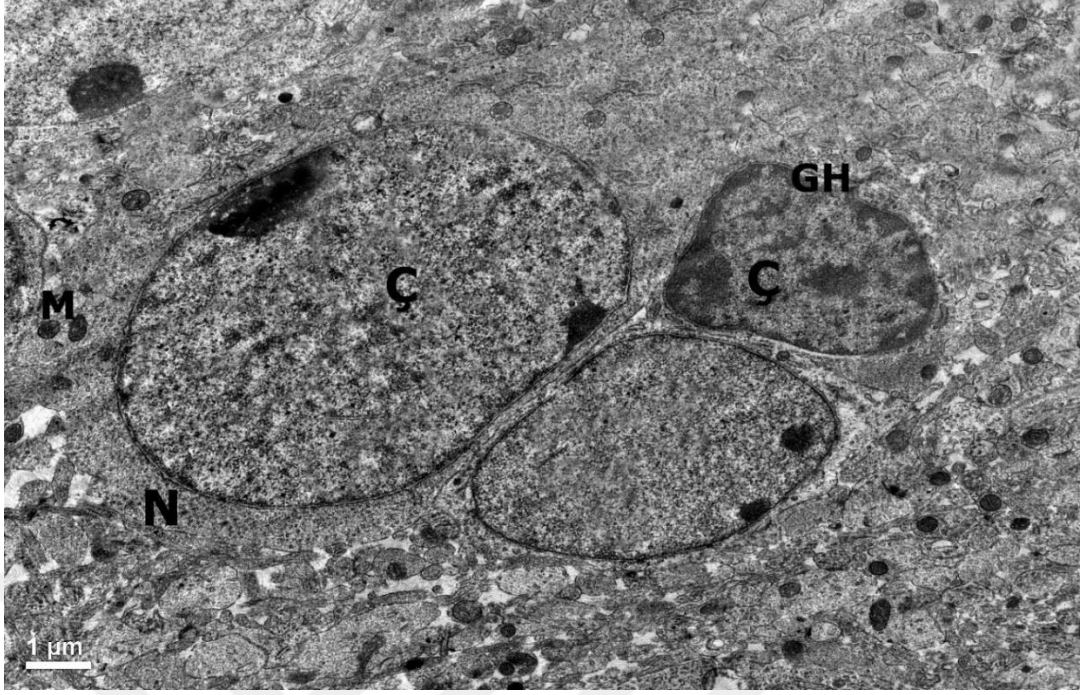


**Şekil 44. Grup S'nin 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü.**

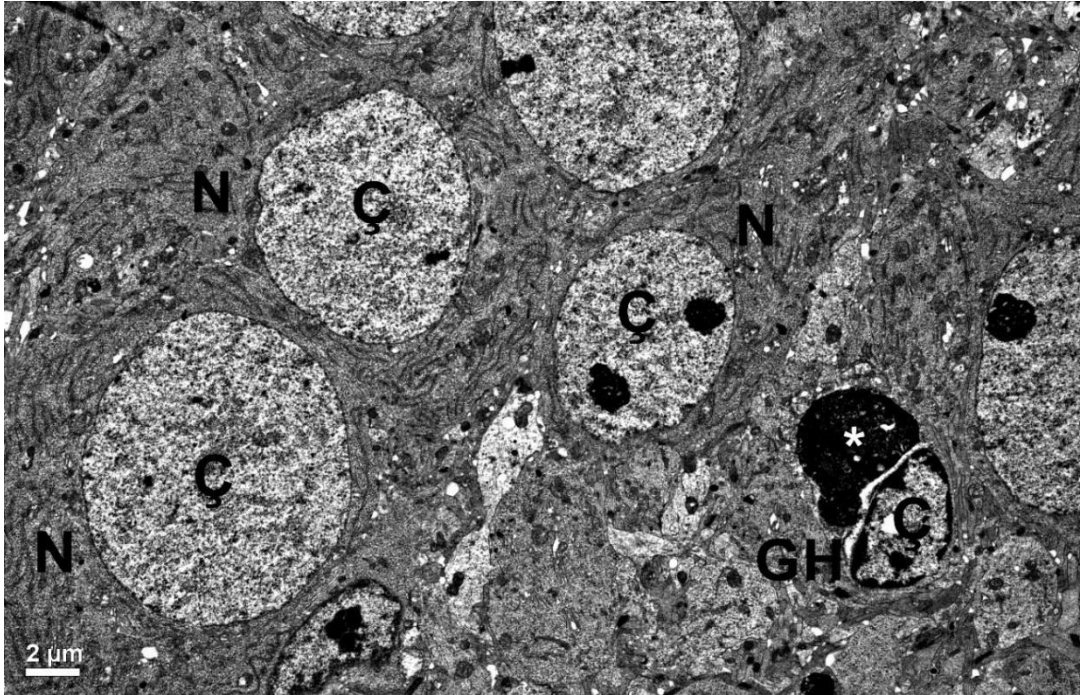
Çoğu nöronda (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapısını korurken, yer yer ödem alanları (\*) izlenmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.

#### **4.3.1.4. Grup SD**

Grup SD'nin 7. gününde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde çoğu nöron ve gliya hücrelerine ait çekirdek ve sitoplazma içeriği normal yapıdaydı. İnterselüler alanda yer yer boşluklar görüldü (Şekil 45). Grup SD'nin 45. gününde alınan hipokampus doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde genel olarak nöron ve gliya hücrelerine ait çekirdekler ve sitoplazmanın ultrastrüktürel yapısı korunmasına rağmen, az sayıda apoptotik hücelere rastlanıldı (Şekil 46).



Şekil 45. Grup SD'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) ve gliya hücrelerine (GH) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapıda izlenmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 2 µm.

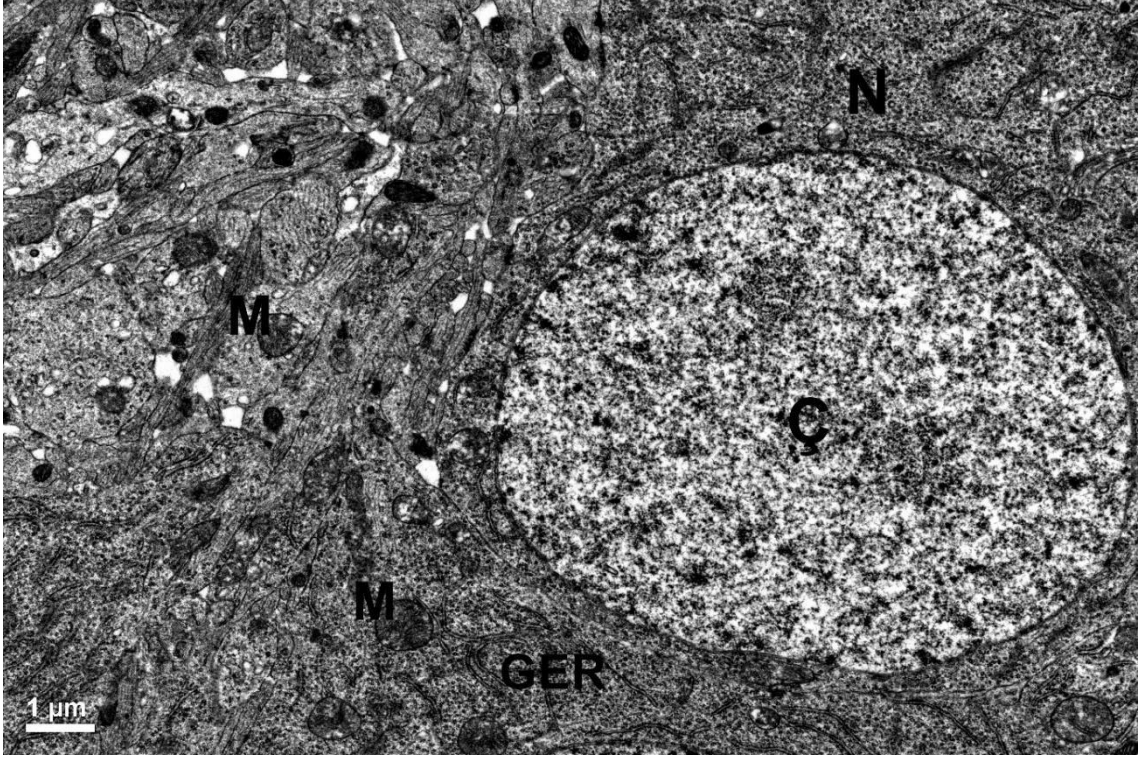


Şekil 46. Grup SD'nin 45. günde alınan hipokampus dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) ve gliya hücrelerine (GH) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapıda izlenmektedir. Az sayıda apoptotik hücreler (\*) görülmektedir. Bar: 2 µm.

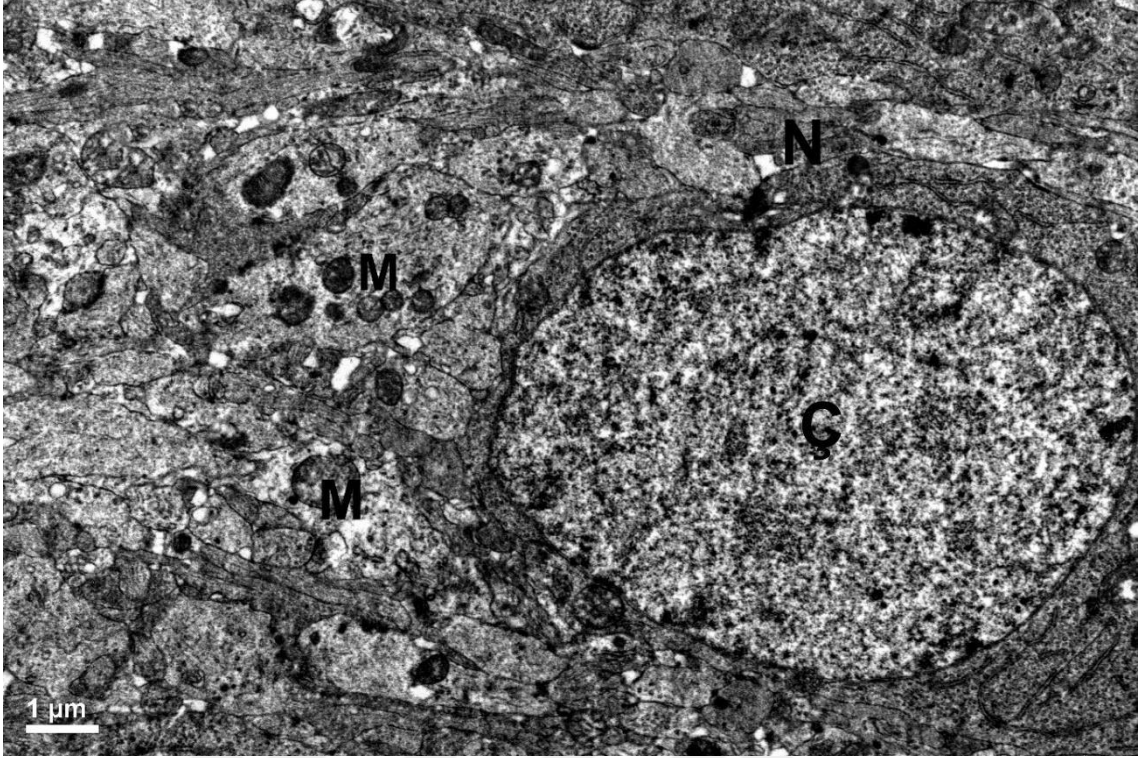
### 4.3.2. Prefrontal Korteks

#### 4.3.2.1. Grup K

Grup K deneklerinden 7. ve 45. günde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlar, gliya hücreleri ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi. Nöron perikaryonları yuvarlak veya oval veziküler bir çekirdek ile granüler endoplazmik retikülüm, mitokondriyonlar, golgi kompleksi, lizozomlar, nörotübül ve nörofilamanlar içermektedir (Şekil 47-48). Gliya hücreleri çekirdek ve sitoplazmik özellikleri ile normal yapıda görüldü. Akson ve miyelin kılıf normal yapıdaydı.



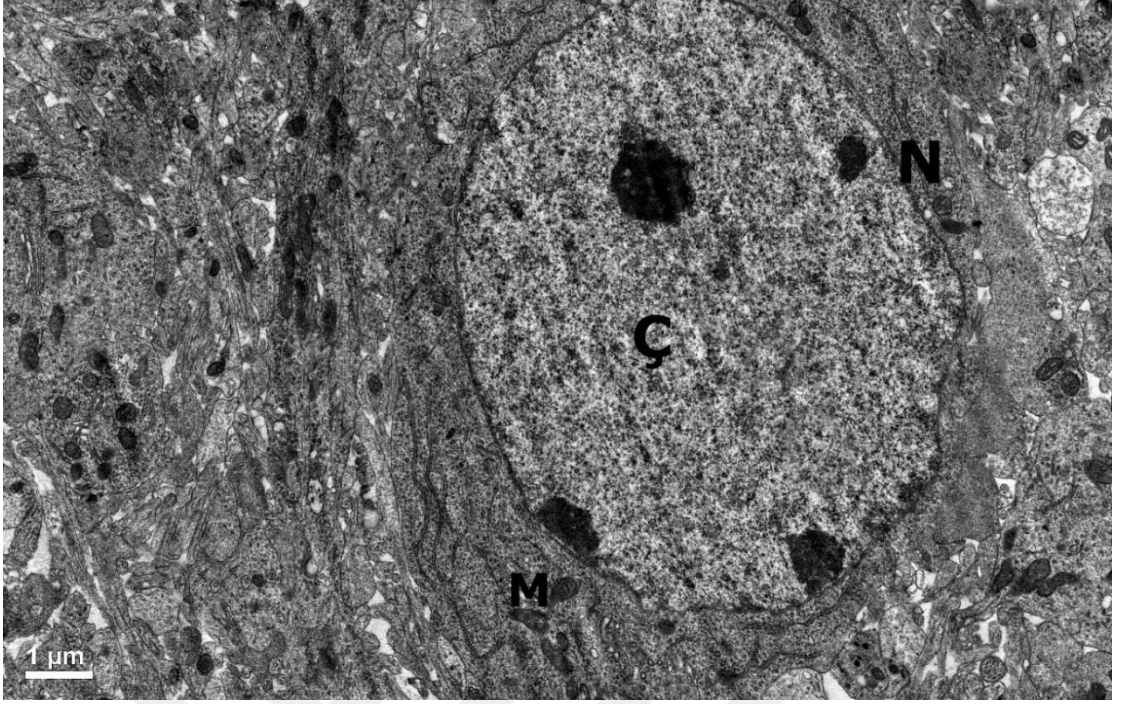
Şekil 47. Grup K'den 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronun (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organellerinin normal yapıda olduğu görülmektedir. Mitokondriyon (M), granüler endoplazmik retikülüm (GER). Bar: 1 µm.



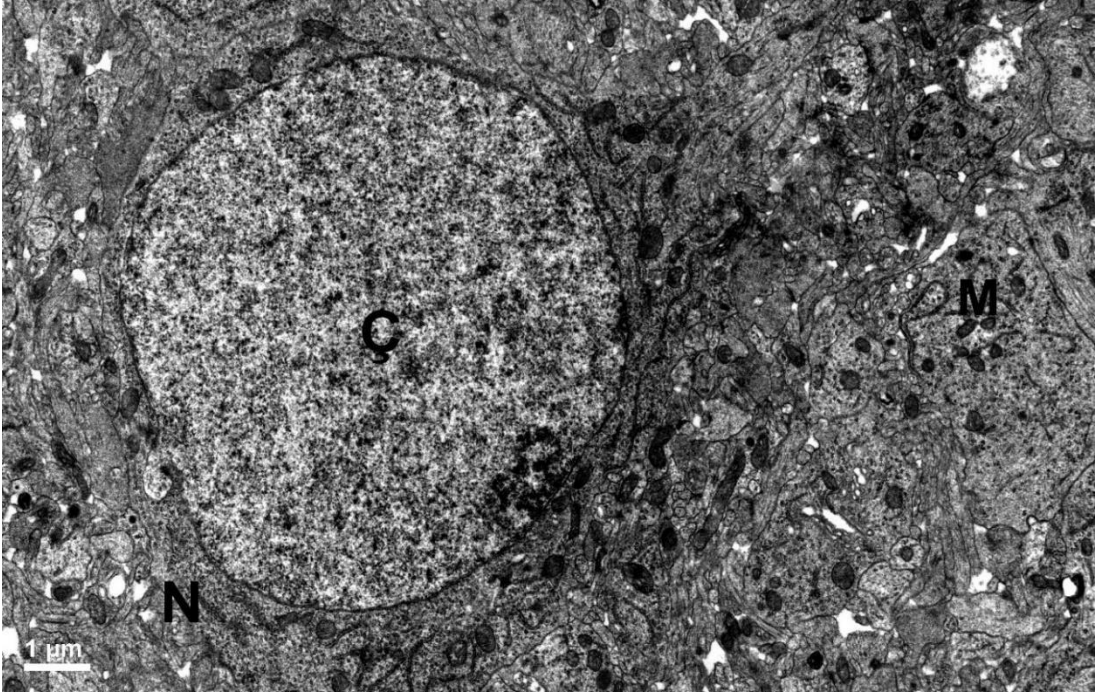
Şekil 48. Grup K'den 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) çekirdeğin (Ç) ve sitoplazmadaki mitokondriyonlar (M) normal yapıda izlenmektedir. Bar: 1 µm.

#### 4.3.2.2. Grup D

Grup D'nin 7. gününde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöron ve gliya hücrelerine ait çekirdek, sitoplazmik organeller, akson ve miyelin kılıf yapıları intaktı (Şekil 49). Grup D'nin 45. gününde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde genel olarak nöron ve gliyalara ait çekirdekler ve sitoplazmanın ultrastrüktürel yapısı normaldi (Şekil 50).



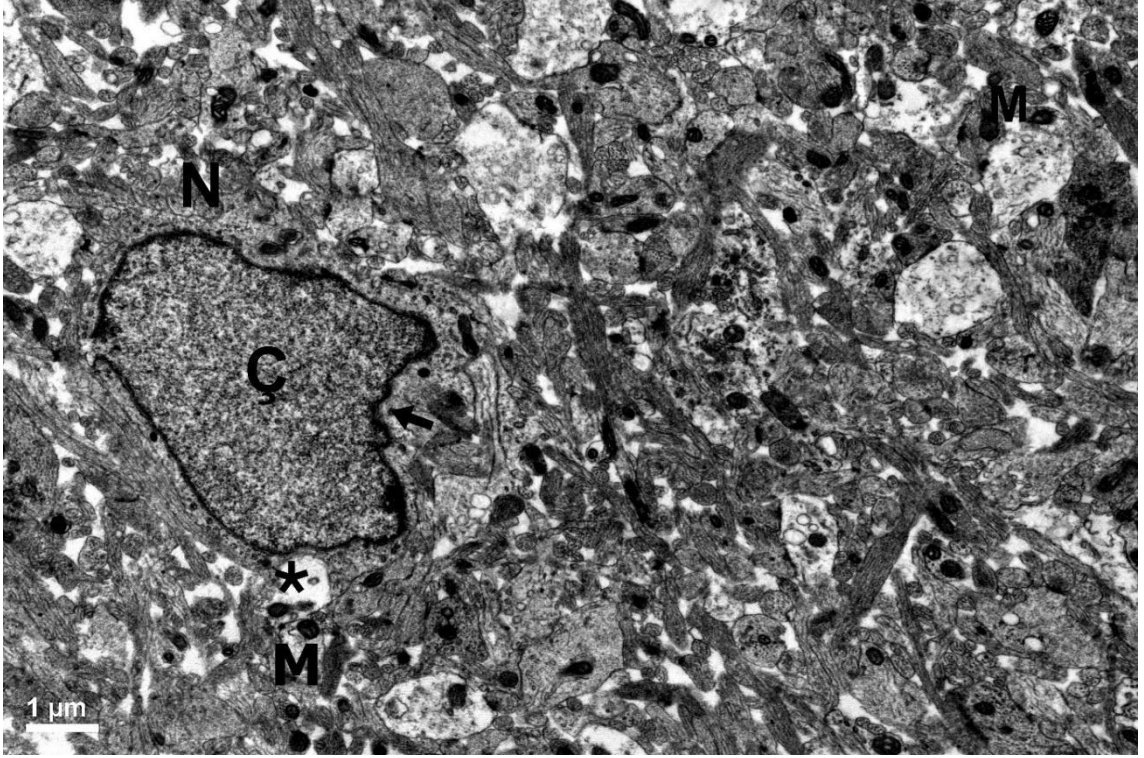
**Şekil 49.** Grup D'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronlara (N) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapıda izlenmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.



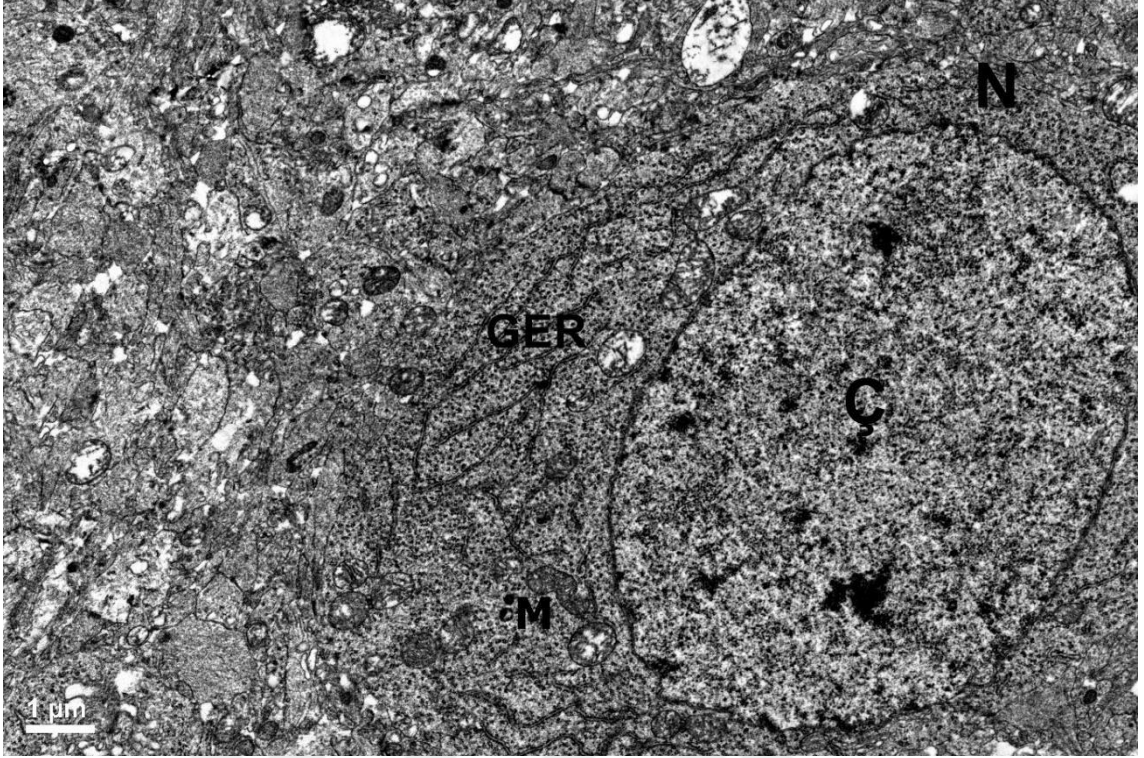
**Şekil 50.** Grup D'nin 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Normal yapıda nöronlara (N) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma görülmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.

#### 4.3.2.3. Grup S

Grup S'nin 7. gününde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöronlara ait çekirdek zarlarında indentasyon, periferik kromatin yoğunlaşması ve nöron sitoplazmalarında vakuolizasyon ile dejenere mitokondriyonlar izlendi. (Şekil 51). Gliya hücreleri nispeten normal görünümünü korumaktaydı. Grup S'nin 45. gününde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde genel olarak nöronlara ait çekirdekler ve sitoplazmanın ultrastrüktürel yapısının korunduğu dikkati çekti. Bazı nöron sitoplazmalarında dejenere mitokondrionlar ve ödem alanlarına rastlanıldı (Şekil 52). Gliya hücreleri normal yapıdaydı.



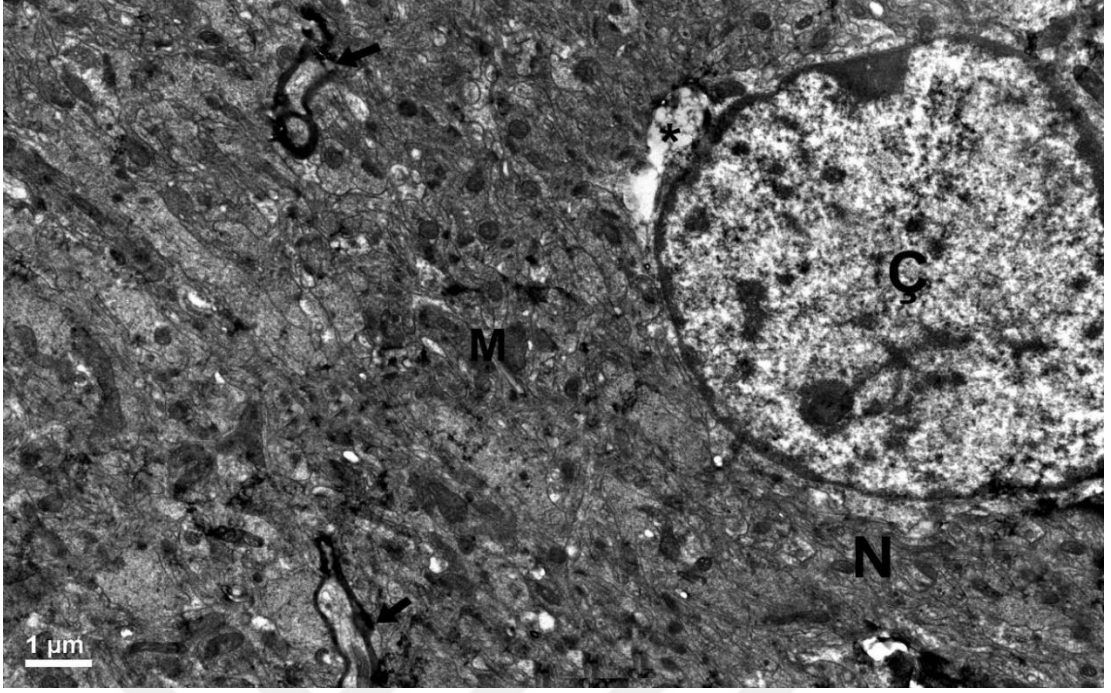
Şekil 51. Grup S'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron (N) çekirdeklerinde (C) indentasyon (ok) ve sitoplazmalarında hafif yapısal değişiklikler (\*) izlenmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.



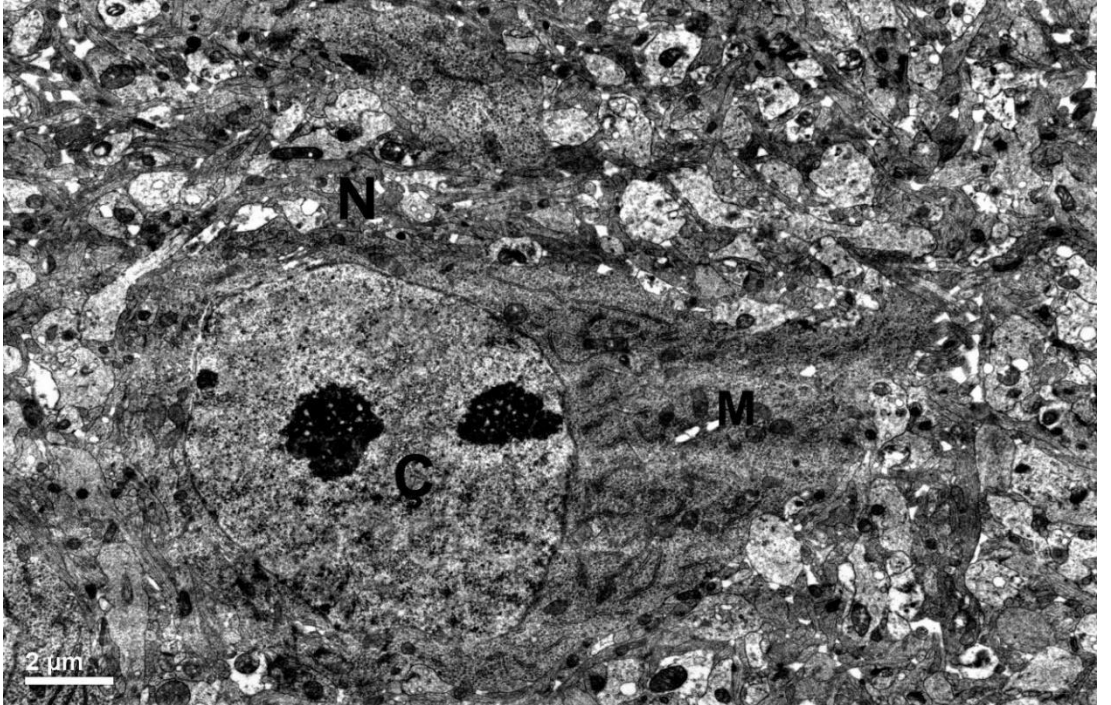
**Şekil 52.** Grup S'nin 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Çoğu nöronda (N) çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapısını korurken, bazı nöron sitoplazmalarında dejenere mitokondriyonlar ve yer yer ödem alanları (\*) izlenmektedir. Granüler endoplazmik retikülüm (GER). Bar: 1 µm.

#### 4.3.2.4. Grup SD

Grup SD'nin 7. gününde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde çoğu nörona ait çekirdek ve sitoplazma içeriği normal yapıdaydı. Bazı nöronlarda yer yer perinükleer boşluklar ile miyelin kılıflarda dejenerasyon mevcuttu (Şekil 53). Gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik organeller normal yapıda izlendi. Grup SD'nin 45. gününde alınan prefrontal korteks doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde nöron ve gliya hücrelerine ait çekirdekler ve sitoplazmanın ultrastrüktürel yapısı korunmaktaydı (Şekil 54).



Şekil 53. Grup SD'nin 7. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazı nöronlarda (N) perinükleer boşluklar (\*) ile dejenere miyelin kılıf (ok) izlenmektedir. Çekirdek (Ç), mitokondriyon (M). Bar: 1 µm.



Şekil 54. Grup SD'nin 45. günde alınan prefrontal korteks dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöronlara (N) ait çekirdek (Ç) ve sitoplazma normal yapıda izlenmektedir. Mitokondriyon (M). Bar: 2 µm.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda gebeliğin 14. gününde 2 saat sevofluran inhalasyonuna maruz kalan farelere gebelik boyunca vitamin D uygulaması ile, bu farelerin yavrularında sevofluranın neden olduğu nöroinflamasyon ve apoptozisin engellenebileceği immünohistokimyasal incelemelerle gösterilmiştir.

Beyinde mikrogliyal aktivasyon ve proinflamatuvar sitokin birikimi (özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-6) sonucu ortaya çıkan nöroinflamasyon insan (112-115) ve hayvanlarda (12, 116, 117) kognitif ve davranışsal bozukluklara neden olabilmektedir. Proinflamatuvar sitokinler, beyin farklı alanlarındaki mikrogliyal hücreleri aktive ederek aynı sitokinlerin üretimini arttırmaktadır(118, 119). Mikroglia aktivasyonu sırasında NF-kB, proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu başlatır. Ancak gelişmekte olan beyinde nöroinflamatuvar yanıtın nasıl hazırlandığı belirsizliğini korumaktadır(72).

Anestezik ajanların nöroinflamasyona neden olduğu mekanizmalar henüz belirlenmemiş olmakla birlikte hipokampusta meydana gelen nöroinflamasyonun, sevoflurana bağlı nörotoksisitenin kaynağı olduğu düşünülmektedir(120). İnhaler anesteziklerin intrastoplazmik kalsiyum seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir ve kalsiyum artışıyla NF-kB aktivasyonu sağlayarak proinflamatuvar sitokin salınımına yol açtıkları düşünülmektedir(45,121, 122). Artan TNF- $\alpha$  ve IL-6 mikrogliyal hücre aktivasyonunu indüklemekte, daha fazla proinflamatuvar sitokin üretilmekte ve bu olaylar kaskadı nöroinflamasyonla sonuçlanmaktadır. Shen ve ark. genç farelerde (6 günlük) 3 gün boyunca günde 2 saat süreyle %3 sevofluran uygulaması ile beyin dokularında IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin arttığı ve kognitif disfonksiyona yol açtığı göstermişlerdir. Ancak aynı çalışmada aynı doz ve süredeki sevofluran uygulamasının 60 günlük erişkin farelerde IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerini arttırmadığı ve mikrogliyal aktivasyona neden olmadığı görülmüştür(120). Hirotsu ve ark. hamile farelere gebeliğin 5,5. gününde 3 saat boyunca %1-%2 oranında sevofluran inhalasyonu uygulayarak maternal sevoflurana maruz kalmanın fetal beyinde proinflamatuvar sitokinleri indükleyip indüklenmediğini test etmişlerdir. Bu çalışmada maternal sevofluran uygulaması ile fetal beyinde IL-6 mRNA ve protein ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir(123).

Bu çalışmaların verileri farklı yaşlardaki farelerin anestezie karşı farklı nöroinflamasyon reaksiyonlarına sahip olabileceğini düşündürmektedir.

D vitamininin santral sinir sisteminin gelişimi ve fonksiyonu üzerinde önemli etkileri vardır ve nöroinflamasyon, bilişsel gerileme ve nörodejenerasyon sürecinde etkin bir role sahiptir (124). VDR, santral sinir sistemindeki nöronlarda, astrositlerde ve mikrogliyalarda bulunur ve NF-kB aktivasyonunun baskılanmasında doğrudan rol oynar(125). Birçok çalışmada, uygun miktarda vitamin D'nin oksidatif stresi ve beyindeki inflamasyonu azalttığı ve çeşitli nöroprotektif faydalar sağladığı bildirilmiştir (22). Ali ve arkadaşları, erişkin farelerde yaşlanma modelinde yaptıkları çalışmalarında, vitamin D'nin oksidatif stresin aracılık ettiği nöroinflamasyonu, sinaptik fonksiyon bozukluğunu ve hafıza bozukluğunu, NF-kB aracılı nöroinflamasyonu inhibe ederek en aza indirdiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada vitaminit D, NF-kB'yi inhibe ederek aynı zamanda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinleri de baskılamıştır(126). Zhang ve ark. ise sevofluran uygulanan yaşlı farelerde yüksek vitamin D düzeyinin hipokampusta TNF- $\alpha$  ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir(127).

Çalışmamızda intrauterin 2. trimesterde sevoflurana maruz kalan anne farelerin bebeklerinden postnatal 7. ve 45. günde alınan hipokampus ve prefrontal doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemelerinde, gebelik boyunca proflaktik vitamin D uygulanan annelerin yavrularında vitamin D uygulanmayan annelerin yavrularına göre IL-6 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunun belirgin derecede azaldığı tespit edildi. Beyindeki proinflamatuvar sitokinler; nöronal gelişimin temel düzenleyicileri, bilişsel işlev bozuklukları ve psikolojik patolojilerle yakından ilişkili olduğundan (123, 128) gebelik sırasında annedeki yeterli vitamin D serum düzeylerinin, acil cerrahi veya fetal cerrahi gibi anestezi uygulamasının kaçınılmaz olduğu durumlarda anestezi ajanlara bağlı nöroinflamasyon ve nörotoksiteyi azaltabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptosis hücre dışı uyarılara yanıt olarak aktive olan mitokondriyal ve endoplazmik retikulum apoptozis yolakları veya DNA hasarı gibi hücre içi olaylar ya da ekstrinsik apoptozis yolaklarının uyarılması nedeniyle meydana gelebilir(8). İnhalasyon anesteziikleri, endoplazmik retikulumun normal yapısı ve işleyişi için gerekli olan kalsiyum homeostazisini bozarak apoptozisi indükleyebilir (13-15). İntrinsik mitokondriyal yol, anti-apoptotik faktör Bcl-2 ve pro-apoptotik faktör Bax dahil olmak üzere Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir(129). Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal dışı membran geçirgenliğini düzenleyerek ve ER'den mitokondriye anormal

kalsiyum akışını önleyerek apoptozisi engelleyebilir (Bcl-2) veya tersine kolaylaştırabilir (Bax) (130).

Bcl-2 ve Bax'ın erken hücre değişikliklerinde apoptozisin ana düzenleyicileri olduğu daha önce bildirilmiştir(131). Xu ve ark. yenidoğan sıçanlara %1, %2 ve %4 konsantrasyonlarda sevofluran inhalasyonu uyguladıkları çalışmalarında, sevofluran konsantrasyonu arttıkça Bax mRNA ekspresyonu artarken; Bcl-2'nin mRNA ekspresyonunun azaldığını ve hipokampal nöron apoptozisinin arttığını saptamışlardır (132). Zhou ve ark. ise yenidoğan sıçanlara 6 saat boyunca %2,3 konsantrasyonda sevofluran inhalasyonu uygulamışlar ve bu sıçan beyinlerinin hipokampusunda, kontrol grubuna göre Bax seviyesinin istatistiksel olarak belirgin şekilde arttığını; Bcl-2 seviyesinin ise azaldığını göstermişler ve gelişmekte olan beyinde sevofluran kaynaklı apoptozisin potansiyel olarak mitokondriyal yol aracılığıyla gerçekleştiği sonucuna varmışlardır(133). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde gebelikte sevofluran uygulanan farelerin yavrularının postnatal 7. günde hipokampus ve prefrontal doku kesitlerinde kontrol grubuna göre Bax seviyesinin arttığını, Bcl-2 seviyesinin ise azaldığını gözledik. Postnatal 45. gün incelemelerinde ise gruplar arasındaki fark, azalmasına rağmen devam etmekteydi. Elektron mikroskobu ile postnatal 7. günde yapılan hipokampus ve prefrontal doku incelemelerinde de kontrol grubuna göre, çekirdek zarlarında indentasyon, periferel kromatin yoğunlaşması ve nöron sitoplazmalarında vakuolizasyon ile dejenere mitokondrionlar izlendi. Ancak postnatal 45. günde bu bulgulardan sadece intersellüler alanlarda vakuolizasyon gözlemlendi.

Vitamin D ve VDR beynin çeşitli bölgelerinde, özellikle de hipokampusta mevcut olduğundan, vitamin D normal beyin fonksiyonu, bilişsel beceriler ve MSS gelişiminin sürdürülmesinde etkin bir rol oynamaktadır(134) . Rastegar-Moghaddam ve ark. hipotiroidisi olan sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında, vitamin D tedavisinin hipokampustaki apoptoziste azalmaya neden olduğunu ve öğrenme ve mekansal hafıza performansını iyileştirdiğini göstermişlerdir(135). Çalışmamızda sevofluran uygulanan annelerin yavrularında, hipokampus ve prefrontal korteks doku incelemelerinde Bax düzeylerinin gebelik boyunca vitamin D uygulanarak sevofluran alan annelerin bebeklerine göre belirgin düzeyde yüksek, Bcl-2 düzeylerinin ise düşük olduğu gözlemlendi.

Elektron mikroskobu ile postnatal 7. ve 45. günlerde yapılan hipokampus ve prefrontal doku incelemelerinde ise vitamin D almadan gebeliğin 14. gününde sevofluran uygulanan farelerin yavrularında, gebelik boyunca vitamin D tedavisi alıp

14. günde sevofluran uygulanan annelerin yavrularına göre nöronal dejenerasyon bulguları çok daha belirgindi. Bu bulgulara dayanarak, gebelik sırasında genel anestezi almak zorunda kalan annelerin bebeklerinde sevofluranın neden olabileceği apoptozis, kognitif disfonksiyon ve davranışsal bozukluklar gibi komplikasyonların annedeki yeterli vitamin D düzeyleri ile engellenebileceği düşünülebilir.

Vitamin D'nin öğrenme ve hafızada önemli olan BDNF gibi nörotrofik faktörleri arttırdığı da gösterilmiştir(136). BDNF, aynı zamanda serebral korteks ve hipokampustaki sinaptik işlevleri de düzenlemektedir(137). BDNF'nin bu önemli etkileri göz önüne alındığında (138), vitamin D'nin öğrenme ve hafıza üzerindeki yararlı etkilerinin BDNF aracılığıyla olduğu öne sürülmüştür. Şahin ve ark. epileptik nöbet geçiren sıçanlarda, vitamin D tedavisinin beyinde BDNF düzeylerini arttırdığını, Bax düzeylerini azalttığını ve hipokampal apoptozise karşı nöroprotektif etkiler gösterdiğini saptamışlardır(139).

Daha önce yapılan in-vitro ve hayvan çalışmalarında, sevoflurana maruziyet ile BDNF düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir(140-142). Yu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada gebeliğin 18. gününde 6 saat boyunca %2,5 oranında sevofluran inhalasyonuna maruz bırakılan sıçanların yavrularında postnatal 1. günde hipokampusta BDNF düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı, postnatal 35. günde ise hafıza ve öğrenme yeteneklerinde bozulma olduğu görülmüştür(141). Çalışmamızda da benzer şekilde sevoflurana maruz kalan farelerin yavrularında postnatal 7. ve 45. günde hipokampus ve prefrontal korteks dokularında BDNF düzeyleri kontrol grubuna göre azalmıştı. Gebelik boyunca profilaktik vitamin D uygulanarak sevoflurana maruz kalan farelerin yavrularında ise hipokampus ve prefrontal korteks dokularındaki BDNF düzeyleri sevofluran grubuna göre belirgin olarak yüksekti. Çalışmamızın sonuçları sevofluranın intrauterin dönemdeki nörotoksik etkilerine karşı vitamin D'nin BDNF aracılığıyla nöroprotektif olarak önemli bir rolü olabileceğini desteklemektedir.

Santral sinir sisteminde beyaz cevherin ana bileşeni, oligodendrosit öncü hücrelerinden (OPC'ler) farklılaşan olgun oligodendrositler tarafından üretilen miyelin

kılıfıdır(143-145). Miyelin, aksiyon potansiyellerinin kesin ve hızlı iletimi ile öğrenme, hafıza ve motor fonksiyon gelişimini sağlarken; oligodensrositler aksonların enerji talebini karşılamak için metabolik destek sağlamaktadır(146, 147). Yapılan çalışmalarda Olig2 transkripsiyon faktörünün oligodendroglial farklılaşmanın pozitif bir düzenleyicisi olarak görev yaptığı gösterilmiştir(148-150). Fan ve ark. gebeliğin 15,5. gününde sevoflurana maruz kalan farelerin yavrularında hipokampusta OPC ekspresyonunun ve CC1<sup>+</sup>/Olig2<sup>+</sup> olgun oligodensrositlerin sayısının önemli ölçüde azaldığını saptamışlar ve gebelikte uygulanan sevofluran anestezisinin yavru farelerde hipokampus gelişiminde miyelinli liflerde hasara neden olduğu sonucuna varmışlardır(151).

Daha önce yapılan çalışmalarda, vitamin D'nin OPC farklılaşmasını teşvik ederek remiyelinizasyona doğrudan dahil olabileceği bildirilmiştir (152-154). VDR, nöral kök hücrelerde (NSC) (152) ve OPC'de (155, 156) gösterilmiştir ve olgun oligodensrositlerde (156), VDR ekspresyonu yüksektir. Ayrıca VDR, OPC farklılaşmasına katılır(157); in vitro çalışmalarda VDR'nin bloke edilmesi ile OPC farklılaşmasının azaldığı ve vitamin D uygulaması ile NSC'lerin çoğalmasının teşvik edildiği gösterilmiştir(158). Gomez-Pinedo ve ark. sıçanlarda serebral hasar oluşturarak yaptıkları çalışmalarında, vitamin D takviyesinin lezyon bölgesinde nöronal kök hücrelerin (Doublecortin<sup>+</sup>) ve OPC'lerin (Olig2<sup>+</sup>) differansiyasyonunu arttırdığını; aynı artışın vitamin D almayan sıçanlarda meydana gelmediğini gözlemişlerdir(159). Biz de çalışmamızda gebelik boyunca vitamin D uygulanarak sevoflurana maruz kalan farelerin yavrularındaki hipokampal ve prefrontal kesitlerin immünohistopatolojik incelemesinde Olig2 düzeyinin sadece sevofluran alan annelerin yavrularındakine göre daha yüksek olduğu saptadık. Dolayısıyla çalışmamızın sonuçları, intrauterin dönemde sevoflurana maruz kalan bebeklerde, annedeki yeterli vitamin D seviyeleri ile sevoflurana bağlı oluşabilecek nörotoksik etkilerin engellenebileceğini desteklemektedir.

Fötal nörolojik gelişimin erken dönemlerinde meydana gelen süreçler, çevresel ve farmakolojik etkilere son derece duyarlıdır(160-162).  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA) gelişmekte olan beyinde trofik bir faktördür (163) ve erken nöral gelişim sırasındaki GABAerjik uyarım, sinirsel bağlantıyı değiştirerek yaşam boyu davranışsal bozukluklara neden olabilir(163, 164). Tüm inhaler anestezikler çoklu reseptörlere etki eden pleiotropik

ajanlardır ve GABA tip A (GABA-A) reseptörü bunların temel etki alanlarından biridir(165). Sevofluran, presinaptik transmitter salınımını bloke ederek veya postsinaptik salınımı baskılayarak GABA-A reseptörleri (166) ve/veya glutamat reseptörleri (167) gibi ligand kapılı iyon kanalları ile etkileşime girebilir(168). Dolayısıyla gebelikte veya hayatın erken döneminde inhaler anestezi ajanlara maruz kalmanın fetal ve neonatal beyin üzerinde davranışsal anormalliklere yol açması mümkündür. Jimenez-Tellez ve ark. neonatal dönemde sevoflurana maruz kalan sıçanlarda yapılan çalışmalarında açık alan testleri sırasında kaygı düzeylerinin sevoflurana maruz kalmayan sıçanlara göre daha yüksek olduğu ve hafıza fonksiyonunun bozulduğunu saptamışlardır(169). Palanisamy ve ark. intrauterin 2. trimesterde izofluran uygulanan sıçanların yavrularında, kontrol grubuna göre hafıza fonksiyonunda azalma bulmuşlar, ancak kaygı benzeri davranışları değerlendiren yükseltilmiş artı labirent testinde fark gösterememişlerdir(170). Yenidoğan farelerde sevoflurana maruziyet ile dürtüsel davranış bozukluğu arasındaki ilişkinin incelendiği başka bir çalışmada ise benzer şekilde yükseltilmiş artı labirent testinde kontrol grubuna göre fark gösterilememiş ve sevoflurana maruz kalmanın anksiyeteyi tetikleme üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır(171). Bizim çalışmamızda ise gebeliğin 14. gününde sevofluran alan farelerin yavrularında, sevofluran ve vitamin D alan annelerin yavrularına ve kontrol grubuna göre açık alan ve yükseltilmiş artı labirent davranış testlerinde kaygı düzeyleri açısından herhangi bir fark bulamadık. Çalışmamızda immünohistokimyasal incelemelerde gruplar arasında önemli farklar olsa da davranış testlerinde fark bulunamamasının nedeni erken dönemde santral sinir sisteminin komplike gelişim aşamaları, sevofluranın beyindeki pleiotropik fonksiyonları, ajanın zamanlama ve maruz kalma süresi gibi nedenlerle farklı davranışsal fenotiplerin ortaya çıkması olabilir.

C-Fos, beyinde çeşitli davranışlar ve uyaranlar tarafından aktive olan nöronlar tarafından eksprese edilir ve nöronal aktivasyon için güvenilir bir belirteçdir(172). Nöronlar; c-Fos ekspresyonu için çevresel, psikolojik ve farmakolojik birçok uyarana yanıt vermektedir(173). Xie ve ark. 3 gün art arda ve 2 saat süre ile %3 sevofluran inhalasyonu uyguladıkları neonatal farelerde yaptıkları çalışmalarında, sevofluran uygulanan farelerin medial prefrontal korteks incelemelerinde kontrol grubuna göre cFos

ekspresyonunda belirgin bir artış göstermişlerdir. Ancak anksiyete ve korku ile ilişkili beyin bölgelerindeki c-Fos ekspresyonu, sevofluranla tedavi edilen fareler ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark göstermemiş ve aynı zamanda yükseltilmiş artı labirent testinde de fark bulunamamıştır. Bu çalışmada medial prefrontal kortekste ki nöronların sevofluranın neden olduğu nörotoksositeye karşı savunmasız olduğu ve sevofluran ile aşırı aktivasyonlarının yetişkinlik döneminde dürtüsel davranış bozukluklarına yol açabileceği sonucuna varılmıştır (171). Bizim çalışmamızda ise intrauterin dönemde sevoflurana maruz kalan yavruların prefrontal ve hipokampal doku kesitlerinde c-Fos ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin derecede arttığı, profilaktik olarak vitamin D uygulanan farelerin yavrularında ise ekspresyonun vitamin

D uygulanmayanlara göre belirgin olarak azaldığı görüldü. Xie ve ark.'nın çalışmaları ile benzer şekilde davranış testlerinde biz de gruplar arasında anlamlı bir fark saptayamadık. Bu sonuçlara dayanarak intrauterin dönemde sevoflurana maruz kalan bebeklerde yetişkinlik döneminde ortaya çıkabilecek dürtüsel davranış bozukluklarına karşı vitamin D'nin nöroprotektif etkilerinin olabileceği ve gelecekte daha ileri ve kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği kanısındayız.

Çalışmamızın bazı önemli noktalarda kısıtlılığı mevcuttur. Öncelikle uyguladığımız metotta gebe farelere cerrahi uygulamadık. Dolayısıyla cerrahinin neden olacağı stres yanıtının yavrulardaki sevofluran toksisitesine ve davranış değişikliğine katkısını değerlendirmedik. Ayrıca yavruların kognitif fonksiyonlarını değerlendiren testlerin yapılmamış olması diğer bir kısıtlayıcı faktörü oluşturmaktadır. Son olarak çalışmamızda taşıyıcı gaz olarak %97.5-100 oksijen inhalasyonu kullandık. İn vitro çalışmalarda hiperoksinin gelişmekte olan nöronlara zararlı olabileceği öne sürülmüştür (1) ve sonuçlarımızdaki etkileri sorgulanabilir. Ancak kontrol gruplarına da aynı süre boyunca %100 oksijen uyguladık ve plasentadaki arteriyovenöz sirkülasyon nedeniyle fetüslerin yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kalmadığını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ

Her yıl birçok hamile kadın, trafik kazaları, appendektomi gibi acil durumlar veya konjenital akciğer kitleleri, konjenital diyafragma hernisi gibi f tal cerrahiler nedeniyle obstetrik olmayan ameliyatlar geçirmek zorunda kalmaktadır(174). Bu operasyonların çoğu nöral sinaptogenezinin kritik “büyüme atağı” evresi olan ikinci trimesterde gerçekleştirilir(175, 176) ve kullanılan anestezi ajanlarının bebeklerde n rogele imsel bozulmaya ve bilişsel işlev bozukluğuna neden olabileceği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir(18). Sevofluran günümüzde en yaygın kullanılan inhalasyon anestezi idir ve hamile farelerin yavrularında nörotoksisiteye ve bilişsel işlev bozukluğuna neden olabileceğini gösterilmiştir (177-180). vitamin D’nin santral sinir sisteminin gelei imi ve fonksiyonu üzerindeki etkileri ve anti-inflamatuvar, antiapoptotik ve nöroprotektif etkileri bilinmemektedir(181). Çalışmamızda, gebeliğin 2. trimesterinde sevoflurana maruz kalan farelerin yavrularında, sevofluranın hipokampus ve prefrontal korteks üzerindeki nörotoksik etkilerinin vitamin D tarafından  nlenebilece i immünohistokimyasal incelemelerde gösterilmiştir. Vitamin D eksikliği, en sık ve şiddetli olarak hamile kadınlarda görülmekle birlikte yaygın bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Gebelik sırasında anestezi almak zorunda kalan kadınlara bebeklerinde görülebilecek anesteziye ba lı nörotoksisitenin yeterli vitamin D düzeyleriyle engellenebilece i ve bu konuda gelecekte daha ileri ve kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. **Wilder RT, Flick RP, Sprung J, Katusic SK, Barbaresi WJ, Mickelson C, et al.**, editors. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. The Journal of the American Society of Anesthesiologists; **2009**: The American Society of Anesthesiologists.
2. **Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan GJIJoN.** Neuroinflammation pathways: a general review. **2017**;127(7):624-33.
3. **Jevtovic-Todorovic V, Absalom A, Blomgren K, Brambrink A, Crosby G, Culley D, et al.** Anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity: an expert group report and statement based on the BJA Salzburg Seminar. **2013**;111(2):143-51.
4. **Robinson JL, McBreaity LE, Randell EW, Brunton JA, Bertolo RFJTJoNB.** Restriction of dietary methyl donors limits methionine availability and affects the partitioning of dietary methionine for creatine and phosphatidylcholine synthesis in the neonatal piglet. **2016**;35:81-6.
5. **DiMaggio C, Sun LS, Li GJA, Analgesia.** Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort. **2011**;113(5):1143-51.
6. **Goodman S**, editor Anesthesia for nonobstetric surgery in the pregnant patient. Seminars in perinatology; **2002**: Elsevier.
7. **Kuczkowski KMJO**, survey g. Nonobstetric surgery during pregnancy: what are the risks of anesthesia? **2004**;59(1):52-6.
8. **Chai D, Cheng Y, Jiang HJIJoDN.** Fundamentals of fetal toxicity relevant to sevoflurane exposures during pregnancy. **2019**;72:31-5.
9. **de Graaf-Peters VB, Hadders-Algra MJEhd.** Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? **2006**;82(4):257-66.
10. **Abeti R, Duchon MRJNr.** Activation of PARP by oxidative stress induced by  $\beta$ -amyloid: implications for Alzheimer's disease. **2012**;37:2589-96.
11. **Sparkman NL, Buchanan JB, Heyen JR, Chen J, Beverly JL, Johnson RWJJoN.** Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. **2006**;26(42):10709-16.
12. **Teeling J, Perry VJN.** Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. **2009**;158(3):1062-73.
13. **Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GCJO.** Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. **2003**;22(53):8608-18.
14. **Brostrom CO, Brostrom MAJArop.** Calcium-dependent regulation of protein synthesis in intact mammalian cells. **1990**;52(1):577-90.
15. **Waldron RT, Short AD, Meadows JJ, Ghosh TK, Gill DLJJoBC.** Endoplasmic reticulum calcium pump expression and control of cell growth. **1994**;269(16):11927-33.
16. **Amrock LG, Starner ML, Murphy KL, Baxter MGJA.** Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure. **2015**;122(1):87-95.

17. **Lunardi N, Ori C, Erisir A, Jevtovic-Todorovic VJNr.** General anesthesia causes long-lasting disturbances in the ultrastructural properties of developing synapses in young rats. **2010**;17:179-88.
18. **Zheng H, Dong Y, Xu Z, Crosby G, Culley DJ, Zhang Y, et al.** Sevoflurane anesthesia in pregnant mice induces neurotoxicity in fetal and offspring mice. **2013**;118(3):516-26.
19. **Alifu X, Si S, Qiu Y, Cheng H, Huang Y, Chi P, et al.** The Association of Vitamin D during Pregnancy and mRNA Expression Levels of Inflammatory Factors with Preterm Birth and Prelabor Rupture of Membranes. **2023**;15(15):3423.
20. **Charoenngam N, Holick MFJN.** Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. **2020**;12(7):2097.
21. **Vojinovic JJAotNYAoS.** Vitamin D receptor agonists' anti-inflammatory properties. **2014**;1317(1):47-56.
22. **Kim HA, Perrelli A, Ragni A, Retta F, De Silva TM, Sobey CG, et al.** Vitamin D deficiency and the risk of cerebrovascular disease. **2020**;9(4):327.
23. **Cui C, Xu P, Li G, Qiao Y, Han W, Geng C, et al.** Vitamin D receptor activation regulates microglia polarization and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats and angiotensin IIexposed microglial cells: Role of renin-angiotensin system. **2019**;26:101295.
24. **Guo X, Yuan J, Wang J, Cui C, Jiang PJBr.** Calcitriol alleviates global cerebral ischemia-induced cognitive impairment by reducing apoptosis regulated by VDR/ERK signaling pathway in rat hippocampus. **2019**;1724:146430.
25. **Alessio N, Belardo C, Trotta MC, Paino S, Boccella S, Gargano F, et al.** Vitamin D deficiency induces chronic pain and microglial phenotypic changes in mice. **2021**;22(7):3604.
26. **Langa F, Leibrockc KJN.** Brain function and neuropsychiatric disease. **2019**;27:40-9.
27. **Brown EN, Pavone KJ, Naranjo M.** Multimodal General Anesthesia: Theory and Practice. Anesthesia and analgesia. **2018**;127(5):1246-58.
28. **Ağrı KZJLY, Ankara. Kayhan Z (ed) Klinik Anestezi.** 3. baskı. **2004**;922.
29. **Son Y.** Molecular mechanisms of general anesthesia. Korean journal of anesthesiology. **2010**;59(1):3-8.
30. **Barash PG.** Clinical anesthesia: Lippincott Williams & Wilkins; **2009**.
31. **Butterworth IV JF, Mackey DC, Wasnick JDJCA. Morgan & Mikhail's.** **2013**.
32. **Deile M, Damm M, Heller AR.** [Inhaled anesthetics]. Der Anaesthesist. **2013**;62(6):493-504.
33. **Becker DE, Rosenberg M.** Nitrous oxide and the inhalation anesthetics. Anesthesia progress. **2008**;55(4):124-30; quiz 31-2.
34. **De Hert S, Moerman AJF.** Sevoflurane. **2015**;4(F1000 Faculty Rev).
35. **Behne M, Wilke H-J, Harder SJCp.** Clinical pharmacokinetics of sevoflurane. **1999**;36:13-26.
36. **Goa KL, Noble S, Spencer CMJPD.** Sevoflurane in paediatric anaesthesia: a review. **1999**;1:12753.

37. **Patel SS, Goa KLJD.** Sevoflurane: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia. **1996**;51:658-700.
38. **Schwender D, End H, Daunderer M, Fiedermutz M, Peter KJDA.** Sevofluran und Nervensystem. **1998**;47:S37-S42.
39. **Huang X, Ying J, Yang D, Fang P, Wang X, Zhou B, et al.** The mechanisms of sevoflurane-induced neuroinflammation. **2021**;13:717745.
40. **Prinz M, Jung S, Priller JJC.** Microglia biology: one century of evolving concepts. **2019**;179(2):292-311.
41. **Boche D, Perry V, Nicoll JJN,** neurobiology a. Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **2013**;39(1):3-18.
42. **Zhang L, Zhang J, Yang L, Dong Y, Zhang Y, Xie ZJBjoa.** Isoflurane and sevoflurane increase interleukin-6 levels through the nuclear factor-kappa B pathway in neuroglioma cells. **2013**;110(suppl\_1):i82-i91.
43. **Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al.** Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. **2013**;4(3):e525-e.
44. **Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore DJNn.** NF- $\kappa$ B functions in synaptic signaling and behavior. **2003**;6(10):1072-8.
45. **Yang H, Liang G, Hawkins BJ, Madesh M, Pierwola A, Wei HJTJotASoA.** Inhalational anesthetics induce cell damage by disruption of intracellular calcium homeostasis with different potencies. **2008**;109(2):243-50.
46. **Sun Z, Satomoto M, Adachi YU, Makita KJKJA.** Blood-brain barrier disruption caused by neonatal sevoflurane-induced depends on exposure time and is reversible in mice. **2019**;72(4):38991.
47. **Acharya NK, Goldwaser EL, Forsberg MM, Godsey GA, Johnson CA, Sarkar A, et al.** Sevoflurane and isoflurane induce structural changes in brain vascular endothelial cells and increase blood– brain barrier permeability: possible link to postoperative delirium and cognitive decline. **2015**;1620:29-41.
48. **Zhou B, Chen L, Liao P, Huang L, Chen Z, Liao D, et al.** Astroglial dysfunctions drive aberrant synaptogenesis and social behavioral deficits in mice with neonatal exposure to lengthy general anesthesia. **2019**;17(8):e3000086.
49. **Han C, Zhang Z, Guo N, Li X, Yang M, Peng Y, et al.** Effects of sevoflurane inhalation anesthesia on the intestinal microbiome in mice. **2021**;11:217.
50. **Kalb A, von Haefen C, Sifringer M, Tegethoff A, Paeschke N, Kostova M, et al.** Acetylcholinesterase inhibitors reduce neuroinflammation and-degeneration in the cortex and hippocampus of a surgery stress rat model. **2013**;8(5):e62679.
51. **Shichino T, Murakawa M, Adachi T, Arai T, Miyazaki Y, Mori KJBjoa.** Effects of inhalation anaesthetics on the release of acetylcholine in the rat cerebral cortex in vivo. **1998**;80(3):365-70.
52. **Naruo H, Onizuka S, Prince D, Takasaki M, Syed NIJTJotASoA.** Sevoflurane blocks cholinergic synaptic transmission postsynaptically but does not affect short-term potentiation. **2005**;102(5):9208.
53. **Pavlov VA, Tracey KJJB,** behavior,, immunity. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **2005**;19(6):493-9.

54. **Negoita S, Gica N, Ciobanu AM, Peltecu G, Panaitescu AMJRmJ.** Anesthesia during pregnancy. **2022**;69.
55. **Costantine MMJFip.** Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. **2014**;5:65. **56. Hegewald MJ, Crapo ROJCicm.** Respiratory physiology in pregnancy. **2011**;32(1):1-13.
57. **Pacheco LD, Costantine MM, Hankins GDJCpdp.** Physiologic changes during pregnancy. **2013**:5-16.
58. **Hong J-Y, Park JW, Oh JIJJoca.** Comparison of preoperative gastric contents and serum gastrin concentrations in pregnant and nonpregnant women. **2005**;17(6):451-5.
59. **Upadya M, Saneesh PJJJoA.** Anaesthesia for non-obstetric surgery during pregnancy. **2016**;60(4):234.
60. **Li X, Jiang X, Zhao PJFiP.** Effects of pregnancy anesthesia on fetal nervous system. **2021**;11:523514.
61. **Littleford JJCJoA.** Effects on the fetus and newborn of maternal analgesia and anesthesia: a review. **2004**;51(6):586.
62. **Kunitz O, Rossaint RJDC.** Anesthesia during pregnancy. **2005**;76:737-43.
63. **Cheung HM, Yew DTWJFiN.** Effects of perinatal exposure to ketamine on the developing brain. **2019**;13:138.
64. **Kaneko T, Iwama H, Tobishima S, Watanabe K, Komatsu T, Takeichi K, et al.** Placental transfer of vecuronium administered with priming principle regimen in patients undergoing cesarean section. **1997**;46(6):750-4.
65. **Walton NKD, Melachuri VKJCEiA, Critical Care, Pain.** Anaesthesia for non-obstetric surgery during pregnancy. **2006**;6(2):83-5.
66. **Okeagu CN, Anandi P, Gennuso S, Hyatali F, Stark CW, Prabhakar A, et al.** Clinical management of the pregnant patient undergoing non-obstetric surgery: review of guidelines. **2020**;34(2):269-81.
67. **Chan MT, Mainland P, Gin TJTJotASoA.** Minimum alveolar concentration of halothane and enflurane are decreased in early pregnancy. **1996**;85(4):782-6.
68. **Izci B, Vennelle M, Liston W, Dundas K, Calder A, Douglas NJERJ.** Sleep-disordered breathing and upper airway size in pregnancy and post-partum. **2006**;27(2):321-7.
69. **Baraka A, Jabbour S, Tabboush Z, Sibai A, Bijjani A, Karam KJCjoa.** Onset of vecuronium neuromuscular block is more rapid in patients undergoing caesarean section. **1992**;39:135-8.
70. **Carson MJ, Thrash JC, Walter BJCnr.** The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. **2006**;6(5):237-45.
71. **Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma DJNr.** Neuroinflammation: the role and consequences. **2014**;79:1-12.
72. **Harry GJ, Kraft ADJN.** Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. **2012**;33(2):191-206.
73. **Kipp M, Norkute A, Johann S, Lorenz L, Braun A, Hieble A, et al.** Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. **2008**;35(2):235-43.

74. **Huang W-C, Hung M-C**JJobs. Beyond NF- $\kappa$ B activation: nuclear functions of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ . **2013**;20:1-13.
75. **Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, et al.** Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **2000**;356(9232):827-8.
76. **Laflamme N, Lacroix S, Rivest SJ**JoN. An essential role of interleukin-1 $\beta$  in mediating NF- $\kappa$ B activity and COX-2 transcription in cells of the blood–brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. **1999**;19(24):10923-30.
77. **Terrando N, Eriksson LI, Kyu Ryu J, Yang T, Monaco C, Feldmann M, et al.** Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. **2011**;70(6):986-95.
78. **Wu Z, Yu J, Zhu A, Nakanishi HJ**Om, longevity c. Nutrients, microglia aging, and brain aging. **2016**;2016.
79. **Packer L, Tritschler HJ, Wessel KJ**Frb, medicine. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. **1997**;22(1-2):359-78.
80. **Akbar M, Essa MM, Daradkeh G, Abdelmegeed MA, Choi Y, Mahmood L, et al.** Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. **2016**;1637:3455.
81. **Peng Y-L, Liu Y-N, Liu L, Wang X, Jiang C-L, Wang Y-XJ**Jon. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. **2012**;9:1-12.
82. **Terazawa R, Akimoto N, Kato T, Itoh T, Fujita Y, Hamada N, et al.** A kavalactone derivative inhibits lipopolysaccharide-stimulated iNOS induction and NO production through activation of Nrf2 signaling in BV2 microglial cells. **2013**;71:34-43.
83. **Yuan J, Yankner BA**JN. Apoptosis in the nervous system. **2000**;407(6805):802-9.
84. **Hengartner MO**JN. The biochemistry of apoptosis. **2000**;407(6805):770-6.
85. **Merry D, Korsmeyer SJ**Aron. Bcl-2 gene family in the nervous system. **1997**;20(1):245-67.
86. **Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Snider WD, Korsmeyer SJ**JN. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. **1996**;17(3):401-11.
87. **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang XJ**C. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c–dependent activation of caspase-3. **1997**;90(3):405-13.
88. **Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss PJ**C. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. **1998**;94(6):727-37.
89. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **1997**;91(4):479-89.
90. **Huang EJ, Reichardt LF**JArOb. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **2003**;72(1):609-42.

91. **Barbacid MJAotNYAoS.** Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. **1995**;766:442-58.
92. **Benarroch EEJN.** Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. **2015**;84(16):1693-704.
93. **Meijer DH, Kane MF, Mehta S, Liu H, Harrington E, Taylor CM, et al.** Separated at birth? The functional and molecular divergence of OLIG1 and OLIG2. **2012**;13(12):819-31.
94. **Marie Y, Sanson M, Mokhtari K, Leuraud P, Kujas M, Delattre J-Y, et al.** OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. **2001**;358(9278):298-300.
95. **Szu J, Wojcinski A, Jiang P, Kesari SJFin.** Impact of the Olig family on neurodevelopmental disorders. **2021**;15:659601.
96. **Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, et al.** Induction of apoptosis by cFos protein. **1996**.
97. **Müller DN, Kleinewietfeld M, Kvakan HJJotr-a-as.** Vitamin D review. **2011**;12(2):125-8.
98. **Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E.** Vitamin D. American journal of physiology Renal physiology. **2005**;289(1):F8-28.
99. **Henry HL, Norman AWJAron.** Vitamin D: metabolism and biological actions. **1984**;4(1):493-520.
100. **Cooke NE, Haddad JGJEr.** Vitamin D binding protein (Gc-globulin). **1989**;10(3):294-307.
101. **Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet GJJocb.** Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms. **2003**;88(2):332-9.
102. **Koduah P, Paul F, Dörr J-MJEJ.** Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. **2017**;8(4):313-25.
103. **Peelen E, Knippenberg S, Muris A-H, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JWC, et al.** Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. **2011**;10(12):733-43.
104. **Dankers W, Colin EM, Van Hamburg JP, Lubberts EJJii.** Vitamin D in autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential. **2017**:697.
105. **Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, et al.** Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **2000**;164(9):4443-51.
106. **Porter NM, Thibault O, Thibault V, Chen K-C, Landfield PWJJoN.** Calcium channel density and hippocampal cell death with age in long-term culture. **1997**;17(14):5629-39.
107. **Landfield PW, Thibault O, Mazzanti ML, Porter NM, Kerr DSJJon.** Mechanisms of neuronal death in brain aging and Alzheimer's disease: role of endocrine-mediated calcium dyshomeostasis. **1992**;23(9):1247-60.
108. **Masoumi A, Goldenson B, Ghirmai S, Avagyan H, Zaghi J, Abel K, et al.**  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D 3 interacts with curcuminoids to stimulate amyloid- $\beta$  clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. **2009**;17(3):703-17.

109. Mizwicki MT, Menegaz D, Zhang J, Barrientos-Durán A, Tse S, Cashman JR, et al. Genomic and nongenomic signaling induced by 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2-vitamin D 3 promotes the recovery of amyloid $\beta$  phagocytosis by Alzheimer's disease macrophages. **2012**;29(1):51-62.
110. de Abreu DF, Eyles D, Feron FJP. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. **2009**;34:S265-S77.
111. Schindowski K, Belarbi K, Buee LJG, brain, behavior. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. **2008**;7:43-56.
112. Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, Nociti V, Frisullo G, Gainotti G, et al. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. **2010**;88(5):1106-12.
113. Schuitemaker A, Dik MG, Veerhuis R, Scheltens P, Schoonenboom NS, Hack CE, et al. Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. **2009**;30(11):1885-9.
114. Tan E-K, Chan L-LJNcpN. Neurovascular compression syndromes and hypertension: clinical relevance. **2007**;3(8):416-7.
115. Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalzstein Y, Ben-Hur T, et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. **2007**;32(8-10):1106-15.
116. Perry VHJB, behavior,, immunity. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **2004**;18(5):407-13.
117. Van Gool WA, Van de Beek D, Eikelenboom PJTL. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. **2010**;375(9716):773-5.
118. Butler MP, O'connor J, Moynagh PNJN. Dissection of tumor-necrosis factor- $\alpha$  inhibition of longterm potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early—but not late—phase LTP. **2004**;124(2):319-26.
119. Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJJE. Actions of TNF- $\alpha$  on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. **2005**;90(5):663-70.
120. Shen X, Dong Y, Xu Z, Wang H, Miao C, Soriano SG, et al. Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. **2013**;118(3):502-15.
121. Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley DJ, et al. Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine. **2008**;28(17):4551-60.
122. Kim D, Cho S-H, Kim J-S, Jo S-H, Lee SJ, Kim K-T, et al. Human astrocytic bradykinin B2 receptor modulates zymosan-induced cytokine expression in 1321N1 cells. **2010**;31(1):101-7.
123. Hirotsu A, Iwata Y, Tatsumi K, Miyai Y, Matsuyama T, Tanaka TJEJoP. Maternal exposure to volatile anesthetics induces IL-6 in fetal brains and affects neuronal development. **2019**;863:172682.
124. Menéndez SG, Giménez VMM, Holick MF, Barrantes FJ, Manucha WJLs. COVID-19 and neurological sequelae: Vitamin D as a possible neuroprotective and/or neuroreparative agent. **2022**;297:120464.
125. Lee PW, Selhorst A, Lampe SG, Liu Y, Yang Y, Lovett-Racke AEJFin. Neuron-specific vitamin D signaling attenuates microglia activation and CNS autoimmunity. **2020**;11:19.

126. Ali A, Shah SA, Zaman N, Uddin MN, Khan W, Ali A, et al. Vitamin D exerts neuroprotection via SIRT1/nrf-2/NF-kB signaling pathways against D-galactose-induced memory impairment in adult mice. **2021**;142:104893.
127. Zhang J, Zhang X, Yang Y, Zhao J, Hu W, Yu YJFiAN. Effect of different vitamin D levels on cognitive function in aged mice after sevoflurane anesthesia. **2022**;14:940106.
128. Hu J, Wu Z, Wang H, Geng H, Huo J, Zhu X, et al. Vitamin D ameliorates apoptosis and inflammation by targeting the mitochondrial and MEK1/2-ERK1/2 pathways in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia. **2022**:4891-906.
129. Cory S, Adams JMJNRC. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **2002**;2(9):647-56.
130. Reed JCJN. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **1997**;387(6635):773-6.
131. Liu F, Jiang Y-J, Zhao H-J, Yao L-Q, Chen L-DJiM. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment and regulates the expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax in rats with cerebral ischaemia-reperfusion injury. **2015**;33(6):478-84.
132. Xu C, Niu J-J, Zhou J-F, Wei Y-SJBRB. MicroRNA-96 is responsible for sevoflurane-induced cognitive dysfunction in neonatal rats via inhibiting IGF1R. **2019**;144:140-8.
133. Zhou X, Xian D, Xia J, Tang Y, Li W, Chen X, et al. MicroRNA-34c is regulated by p53 and is involved in sevoflurane-induced apoptosis in the developing rat brain potentially via the mitochondrial pathway. **2017**;15(4):2204-12.
134. Harms LR, Burne TH, Eyles DW, McGrath JJJBP, endocrinology rC, metabolism. Vitamin D and the brain. **2011**;25(4):657-69.
135. Rastegar-Moghaddam SH, Alipour F, Hosseini M, Ebrahimzadeh-Bideskan AJLS. Antiapoptotic and neurogenic properties in the hippocampus as possible mechanisms for learning and memory improving impacts of vitamin D in hypothyroid rats during the growth period. **2023**;312:121209.
136. Koshkina A, Dudnichenko T, Baranenko D, Fedotova J, Drago FJN. Effects of vitamin D3 in long-term ovariectomized rats subjected to chronic unpredictable mild stress: BDNF, NT-3, and NT4 implications. **2019**;11(8):1726.
137. Bothwell MJNf. Ngf, bdnf, nt3, and nt4. **2014**:3-15.
138. Guo W, Nagappan G, Lu BJDn. Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling. **2018**;78(7):647-59.
139. Şahin S, Gürgen SG, Yazar U, İnce İ, Kamaşak T, Arslan EA, et al. Vitamin D protects against hippocampal apoptosis related with seizures induced by kainic acid and pentylentetrazol in rats. **2019**;149:107-16.
140. Liu H, Jin X, Yin X, Jin N, Liu F, Qian WJJoAsD. PKA-CREB signaling suppresses tau transcription. **2015**;46(1):239-48.
141. Yu Z, Wang J, Zhang P, Wang J, Cui J, Wang HJBJoM, et al. Enriched environment improves sevoflurane-induced cognitive impairment during late-pregnancy via hippocampal histone acetylation. **2020**;53:e9861.
142. Zhao J, Ren J, Liu S, Gong Y, Meng P, Tan H, et al. Repeated exposure to sevoflurane in neonatal rats impairs cognition in adulthood via the PKA-CREB-BDNF signaling pathway. **2021**;22(6):1-8.

143. Wang F, Yang YJ, Yang N, Chen XJ, Huang NX, Zhang J, et al. Enhancing Oligodendrocyte Myelination Rescues Synaptic Loss and Improves Functional Recovery after Chronic Hypoxia. *Neuron*. **2018**;99(4):689-701.e5.
144. Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L. Signals to promote myelin formation and repair. *Nature reviews Neurology*. **2010**;6(5):276-87.
145. Chang KJ, Redmond SA, Chan JR. Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nature neuroscience*. **2016**;19(2):190-7.
146. Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends in cell biology*. **2013**;23(12):644-51.
147. Nave KA. Myelination and the trophic support of long axons. *Nature reviews Neuroscience*. **2010**;11(4):275-83.
148. Mei F, Wang H, Liu S, Niu J, Wang L, He Y, et al. Stage-specific deletion of Olig2 conveys opposing functions on differentiation and maturation of oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. **2013**;33(19):8454-62.
149. Yue T, Xian K, Hurlock E, Xin M, Kernie SG, Parada LF, et al. A critical role for dorsal progenitors in cortical myelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. **2006**;26(4):1275-80.
150. Zhou Q, Choi G, Anderson DJ. The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron*. **2001**;31(5):791-807.
151. Fan Z, Liang L, Ma R, Xie R, Zhao Y, Zhang M, et al. Maternal sevoflurane exposure disrupts oligodendrocyte myelination of the postnatal hippocampus and induces cognitive and motor impairments in offspring. *Biochemical and biophysical research communications*. **2022**;614:175-82.
152. de la Fuente AG, Errea O, van Wijngaarden P, Gonzalez GA, Kerninon C, Jarjour AA, et al. Vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer signaling regulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *The Journal of cell biology*. **2015**;211(5):975-85.
153. Matías-Guío J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia*. **2018**;33(3):177-86.
154. Shirazi HA, Rasouli J, Ciric B, Wei D, Rostami A, Zhang GX. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis through both immunomodulation and oligodendrocyte maturation. *Experimental and molecular pathology*. **2017**;102(3):515-21.
155. Baas D, Prüfer K, Ittel ME, Kuchler-Bopp S, Labourdette G, Sarliève LL, et al. Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia*. **2000**;31(1):59-68.
156. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of chemical neuroanatomy*. **2005**;29(1):21-30.
157. Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B, Kerninon C, Williams A, Krezel W, et al. Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nature neuroscience*. **2011**;14(1):4553.
158. Gu SG, Wang CJ, Zhao G, Li GY. Role of vitamin D in regulating the neural stem cells of mouse model with multiple sclerosis. *European review for medical and pharmacological sciences*. **2015**;19(21):4004-11.

159. Gomez-Pinedo U, Cuevas JA, Benito-Martín MS, Moreno-Jiménez L, Esteban-Garcia N, Torre-Fuentes L, et al. Vitamin D increases remyelination by promoting oligodendrocyte lineage differentiation. *Brain and behavior*. **2020**;10(1):e01498.
160. Manent JB, Jorquera I, Mazzucchelli I, Depaulis A, Perucca E, Ben-Ari Y, et al. Fetal exposure to GABA-acting antiepileptic drugs generates hippocampal and cortical dysplasias. *Epilepsia*. **2007**;48(4):684-93.
161. Hausknecht KA, Acheson A, Farrar AM, Kieres AK, Shen RY, Richards JB, et al. Prenatal alcohol exposure causes attention deficits in male rats. *Behavioral neuroscience*. **2005**;119(1):30210.
162. Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S, Nagata T. Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model: a developmental neurotoxicity study. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. **2009**;27(4):399-405.
163. Wang DD, Kriegstein AR. Defining the role of GABA in cortical development. *The Journal of physiology*. **2009**;587(Pt 9):1873-9.
164. Métin C, Vallee RB, Rakic P, Bhide PG. Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. **2008**;28(46):11746-52.
165. Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *The New England journal of medicine*. **2003**;348(21):2110-24.
166. Yamakura T, Bertaccini E, Trudell JR, Harris RA. Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annual review of pharmacology and toxicology*. **2001**;41:23-51.
167. Sebel LE, Richardson JE, Singh SP, Bell SV, Jenkins A. Additive effects of sevoflurane and propofol on gamma-aminobutyric acid receptor function. *Anesthesiology*. **2006**;104(6):1176-83.
168. Onizuka S, Takasaki M, Syed NI. Long-term exposure to local but not inhalation anesthetics affects neurite regeneration and synapse formation between identified lymnaea neurons. *Anesthesiology*. **2005**;102(2):353-63.
169. Jimenez-Tellez N, Pehar M, Visser F, Casas-Ortiz A, Rice T, Syed NI. Sevoflurane Exposure in Neonates Perturbs the Expression Patterns of Specific Genes That May Underly the Observed Learning and Memory Deficits. *International journal of molecular sciences*. **2023**;24(10).
170. Palanisamy A, Baxter MG, Keel PK, Xie Z, Crosby G, Culley DJ. Rats exposed to isoflurane in utero during early gestation are behaviorally abnormal as adults. *Anesthesiology*. **2011**;114(3):521-8.
171. Xie L, Liu Y, Hu Y, Wang B, Zhu Z, Jiang Y, et al. Neonatal sevoflurane exposure induces impulsive behavioral deficit through disrupting excitatory neurons in the medial prefrontal cortex in mice. *Translational psychiatry*. **2020**;10(1):202.
172. Joo JY, Schaukowitch K, Farbiak L, Kilaru G, Kim TK. Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nature neuroscience*. **2016**;19(1):75-83.
173. Kovács KJ. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*. **2008**;20(6):665-72.
174. Fang F, Song R, Ling X, Peng M, Xue Z, Cang J. Multiple sevoflurane anesthesia in pregnant mice inhibits neurogenesis of fetal hippocampus via repressing transcription factor Pax6. *Life sciences*. **2017**;175:16-22.

- 175. Goodman S.** Anesthesia for nonobstetric surgery in the pregnant patient. *Seminars in perinatology*. **2002**;26(2):136-45.
- 176. Tran KM.** Anesthesia for fetal surgery. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. **2010**;15(1):40-5.
- 177. Song R, Ling X, Peng M, Xue Z, Cang J, Fang F.** Maternal Sevoflurane Exposure Causes Abnormal Development of Fetal Prefrontal Cortex and Induces Cognitive Dysfunction in Offspring. *Stem cells international*. **2017**;2017:6158468.
- 178. Wang Y, Li Y, Xing Q, Han XG, Dong X, Lu Y, et al.** Sevoflurane anesthesia in pregnant rats negatively affects nerve function in offspring potentially via inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Molecular medicine reports*. **2017**;15(5):2753-9.
- 179. Shen X, Xiao Y, Li W, Chen K, Yu H.** Sevoflurane anesthesia during pregnancy in mice induces hearing impairment in the offspring. *Drug design, development and therapy*. **2018**;12:1827-36.
- 180. Zuo Y, Li B, Xie J, Ma Z, Thirupathi A, Yu P, et al.** Sevoflurane anesthesia during pregnancy in mice induces cognitive impairment in the offspring by causing iron deficiency and inhibiting myelinogenesis. *Neurochemistry international*. **2020**;135:104693.
- 181. Holick MF, Mazzei L, García Menéndez S, Martín Giménez VM, Al Anouti F, Manucha WJN.** Genomic or non-genomic? A question about the pleiotropic roles of vitamin D in inflammatorybased diseases. **2023**;15(3):767.
- 182. Palanisamy A, Baxter MG, Keel PK, Xie Z, Crosby G, Culley DJ.** Rats exposed to isoflurane in utero during early gestation are behaviorally abnormal as adults. *Anesthesiology*. **2011**;114(3):521-8.